Aus dem Institut für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. H. Brüster)

UNTERSUCHUNGEN ZUR PATHOPHYSIOLOGIE UND DIAGNOSTIK DER VON-WILLEBRAND-ERKRANKUNG

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
BERNHARD SCHOMMER

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus dem Institut für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. H. Brüster)

UNTERSUCHUNGEN ZUR PATHOPHYSIOLOGIE UND DIAGNOSTIK DER VON-WILLEBRAND-ERKRANKUNG

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

BERNHARD SCHOMMER

1981

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Arnold

Referent
gez.: Prof. Dr. Trobisch

Korreferent
gez.: Priv.-Doz. Dr. Reimers

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Historischer Überblick	1
1.2.	Biochemie und Physiologie des Gerinnungsfaktors VIII	6
1.3.	Morphologie der Thrombozyten	11
1.4.	Aggregation und Freisetzungsreaktion der Thrombozyten	13
1.5.	Fragestellung der Arbeit	18
2.	MATERIALIEN UND METHODEN	19
2.1.	Patientenkollektiv	19
2.2.	Bestimmung der subaqualen Blutungszeit	21
2.3.	Thrombozytenzählung und Messung der Thrombozytenretention	21
2.4.	Gewinnung von PRP und PAP	24
2.5.	Thrombozytenaggregationsstudien	25
2.6.	Bestimmung der Faktor-VIII-Aktivität	31
2.7.	Bestimmung des Faktor-VIII-assoziierten Proteins	32
2.8.	Zweidimensionale Immunelektrophorese des Faktor-VIII-Moleküls	36
3.	ERGEBNISSE	4o
3.1.	Überblick über die diagnostischen Routineparameter	4o
3.2.	Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation	54
3.3.	Zweidimensionale Immunelektrophorese des Faktor-VIII-Moleküls	78
3.4.	Genetische Daten der Patienten	1o5
4.	DISKUSSION	11o
5.	ZUSAMMENFASSUNG	131

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0076

1. EINLEITUNG

1.1. Historischer Überblick

Die erste Mitteilung über eine neue, schwere Blutungserkrankung erschien 1926 und dann in deutscher Sprache 1931 durch E.A.v.WILLEBRAND (42), der über drei miteinander verwandte Familien auf den Alandinseln berichtete. Die Erkrankung war gekennzeichnet durch den dominanten Erbgang (zunächst als X-chromosomal-gebunden angesehen) und die Verlängerung der Blutungszeit bei normalem Ausfall der Gerinnungszeit, wodurch eine sichere Abgrenzung dieser "hereditären Pseudohämophilie" von der "echten" Hämophilie möglich war.

Im Jahre 1933 beschrieben v.WILLEBRAND und JÜRGENS als zusätzliches Charakteristikum der Erkrankung eine Störung der Thrombozytenagglutination, gemessen mit Hilfe des Kapillarthrombometers, und erarbeiteten daraufhin das Konzept der "konstitutionellen Thrombopathie" (43). Gleichzeitig grenzten sie die Erkrankung der Alandinseln von der Thrombasthenie GLANZMANN ab, bei der zusätzlich die Retraktion des Gerinnsels gestört erschien.

Durch mehrere Untersucher (1, 19, 29) wurde 1953 übereinstimmend eine Erniedrigung der Faktor-VIII-Aktivität bei Patienten mit "Pseudohämophilie" festgestellt.

JÜRGENS und LEHMANN bestätigten 1957 diese Ergebnisse auch bei den Patienten der Alandinseln (16).
Im Zuge dieser umfangreichen Nachuntersuchung zeigten sich weitere wesentliche genetische Merkmale der Erkrankung:

1) die hohe Penetranz der Erbanlage, die sich beinahe regelmäßig in jeder Generation findet,
2) die sehr variable Expressivität der klinischen Erscheinungen und der Laborparameter. Es finden sich nebeneinander innerhalb einer Familie leichte, mittelschwere und schwere Verlaufsformen.

Bei Untersuchungen über die Beeinflußbarkeit der pathologischen Parameter zeigten NILSSON und BLOMBÄCK 1957, daß sowohl der erniedrigte Faktor-VIII-Spiegel als auch die verlängerte Blutungszeit durch die Transfusion von Plasma oder Plasmafraktionen korrigiert werden konnten (24).
Die Kausalität der Erkrankung erschien also im wesentlichen in einem Mangel von plasmatischen Faktoren begründet.
Die weitere Analyse der gestörten Thrombozytenfunktion ließ einen Defekt der Plättchenadhäsion an fremden Oberflächen erkennen. Als klinischer Test wurde 1960 von HELLEM (6) bzw. 1963 von SALZMAN (31) die Bestimmung der Thrombozytenretention in der Glasperlensäule eingeführt.

Dieser Test wurde inzwischen von HELLEM selbst (7) und später von NIESSNER (22) entscheidend verbessert.

ZIMMERMAN, RATNOFF und POWELL gelang 1971 erstmalig mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen Faktor VIII eine immunologische Bestimmung des Faktor-VIII-Proteins bei verschiedenen hämorrhagischen Diathesen. Hierbei zeigten die Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung, im Gegensatz zu den Patienten mit Hämophilie A, eine Erniedrigung auch des immunologisch bestimmten Faktor-VIII-Proteins gleichsinnig zur Erniedrigung der Faktor-VIII-Aktivität (44).
Als zusätzlicher diagnostischer Parameter wurde ebenfalls 1971 durch HOWARD und FIRKIN die Bestimmung der Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation eingeführt, die bei einem Teil der Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung typisch pathologisch ausfiel (9). Die gleichen Untersucher wiesen 1973 nach, daß die Fähigkeit der Thrombozyten, nach Ristocetinzugabe zu aggregieren, abhängig ist von einem Plasmafaktor, der den Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung fehlt (1o).
WEISS und Mitarbeiter beschrieben im selben Jahr einen Test zur quantitativen Bestimmung dieses Ristocetin-Cofaktors (39).

UNIV. LEIDEN BIBL.

Das diagnostische Spektrum der von-Willebrand-Erkrankung besteht somit heute aus folgenden, gesicherten Parametern:

1) Bestimmung der Blutungszeit,
2) Bestimmung der Faktor-VIII-Aktivität (= F-VIII-C),
3) immunologische Bestimmung des Faktor-VIII-Moleküls (Faktor-VIII-assoziiertes Protein = F-VIII-AP),
4) Bestimmung des von-Willebrand-Faktors als Ristocetin-Cofaktor (= F-VIII-vWF),
5) Bestimmung der Thrombozytenaggregation nach Ristocetinzugabe,
6) Bestimmung der Thrombozytenretention im Glasperlentest.

Neben diesen gesicherten Kriterien sind in den letzten Jahren zwei grundsätzlich neue Feststellungen zum pathophysiologischen Bild der von-Willebrand-Erkrankung getroffen worden.

Einerseits konnte bei einem Teil der Patienten mit Hilfe der zweidimensionalen Immunelektrophorese eine abnorm schnelle Beweglichkeit des Faktor-VIII-Moleküls festgestellt werden, was als Ausdruck einer verminderten Molekülmasse gedeutet wird. Diese Beobachtung, zunächst von KERNOFF und Mitarbeitern (17) und nahezu zeitgleich von PEAKE, BLOOM und GIDDINGS (27) beschrieben, wurde zwischenzeitlich von einer Reihe von Arbeitsgruppen bestätigt (5, 34, 36, 45).

Die Mitteilungen über dieses pathologische Wanderungsverhalten des Faktor-VIII-Moleküls sind bisher aber nur sporadischer Art. Eine Querschnittuntersuchung eines größeren Patientenkollektivs mit gesicherter von-Willebrand-Erkrankung liegt noch nicht vor. Auch die sehr umfangreiche Studie der Italian Working Group (19) sagt hierüber nichts aus.

Zusätzlich ist von NYMAN und Mitarbeitern (26) 1979 die Mitteilung erfolgt, daß bei einer Familie der Alandinseln mit deutlicher Blutungsneigung ein pathologischer Ausfall der Thrombozytenaggregation nach Arachidonsäurereiz festgestellt werden konnte. Die Zuordnung dieser Familie zum Formenkreis der von-Willebrand-Erkrankung ist allerdings nicht völlig klar. Einerseits finden sich nur bei einem Teil der Familienmitglieder Veränderungen der Laborparameter, wie sie für die von-Willebrand-Erkrankung typisch sind, andererseits entsprechen die klinischen Blutungserscheinungen (Zahnfleisch- und Nasenbluten, Menorrhagien, Blutungen bei Bagatellverletzungen) dem Blutungstyp der von-Willebrand-Erkrankung, und es handelt sich bei der Familie um Verwandte der ersten von von WILLEBRAND 1926 bzw. 1931 beschriebenen Blutersippe. Bei einigen Familienangehörigen konnte neben dem pathologischen Ausfall der Arachidonsäure-induzierten

Thrombozytenaggregation zusätzlich eine Störung der Aggregation nach ADP-, Adrenalin- und Kollagenzugabe beobachtet werden.
Bei diesem Befund handelt es sich aber bisher um eine einzelne Mitteilung, eine Bestätigung durch andere Untersucher steht aus.

1.2. Biochemie und Physiologie des Gerinnungsfaktors VIII

Der Gerinnungsfaktor VIII zählt zur Gruppe der Glykoproteine. Das Molekulargewicht ist mit etwa 2 - 3 Mill. Daltons ungewöhnlich hoch. Es lassen sich insgesamt drei funktionelle Anteile innerhalb des Gesamtmoleküls unterscheiden.
Als Trägerprotein fungiert das Faktor-VIII-assoziierte Protein (F-VIII-AP), ein Glykoprotein mit unterschiedlichem Molekulargewicht, das aus einzelnen identischen Untereinheiten aufgebaut ist.
Die Monomere haben ein Molekulargewicht von etwa 2oo.ooo Daltons und sind über Disulfidbrücken zu größeren Einheiten vernetzt. Die Anzahl der Untereinheiten innerhalb des Gesamtmoleküls ist nicht konstant. Am häufigsten finden sich Faktor-VIII-AP-Polymere mit 8 - 1o Untereinheiten (37).

Gebunden an die Faktor-VIII-AP-Monomere findet sich der Faktor-VIII-von-Willebrand-Faktor (F-VIII-vWF). Dieser dürfte im Bereich der Kohlenhydratseitenkette des Faktor-VIII-AP zu suchen sein und wird bei chemischen Manipulationen rasch zerstört. Faktor-VIII-vWF stellt eine Aktivität dar, die die verlängerte Blutungszeit und die gestörte Thrombozytenfunktion bei Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung zu normalisieren vermag. Die gerinnungsaktive Komponente des Faktors VIII (F-VIII-C) ist ein Molekül mit einem Molekulargewicht von etwa 4o - 6o.ooo Daltons, das über bivalente Kationen mit dem Faktor-VIII-AP-Molekül verbunden ist. Eine Abtrennung vom Faktor-VIII-AP-Molekül ist unter dem Einfluß von Calcium-, Magnesium- oder Natrium-Ionen möglich. Faktor-VIII-C korrigiert den prokoagulatorischen Defekt der Hämophilie A und der von-Willebrand-Erkrankung.

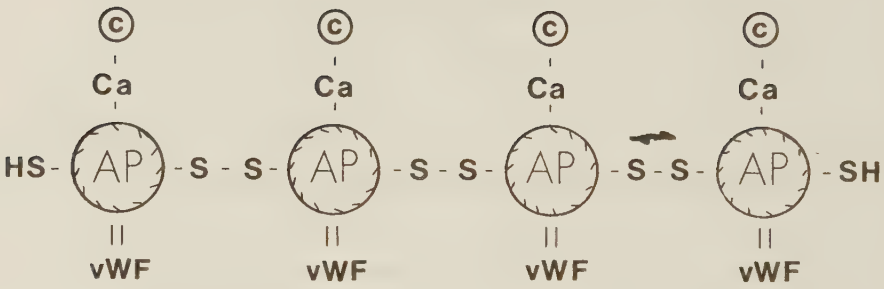


Abb.1: Schematische Darstellung des Faktor-VIII-Moleküls.
(C = Faktor-VIII-C
AP = Faktor-VIII-AP
vWF = Faktor-VIII-vWF)

Der Faktor-VIII-Molekülverband spielt eine wichtige Rolle im Synergismus zwischen zellulärem und plasmatischem Hämostasesystem. Durch Adsorption des Faktor-VIII-Moleküls an die Thrombozytenoberfläche wird über den Faktor-VIII-vWF eine reversible Thrombozytenaggregation mitinduziert. Andererseits bildet der an Phospholipide der Thrombozyten (= "Plättchenfaktor 3") fixierte Faktor-VIII-C zusammen mit dem aktivierten Faktor IX den endogenen Aktivator des Faktor X und löst damit den weiteren Ablauf der Gerinnungskaskade aus.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie konnte das Vorkommen von Faktor-VIII-assoziiertem Protein in den Endothelzellen der Gefäße und in den Leber- und Milzsinusoiden nachgewiesen werden (2, 11). Nach Versuchen mit Zellkulturen muß die Synthese des Faktor-VIII-AP in den Zellen des retikulo-histiozytären Systems und die spätere Freisetzung in das umgebende Medium als gesichert angesehen werden (14).
Entsprechend ließ sich bei Patienten mit schwerer von-Willebrand-Erkrankung in der Gefäßintima Faktor-VIII-assoziiertes Protein nicht nachweisen, während der Befund bei Patienten mit schwerer Hämophilie A positiv ausfiel (8).

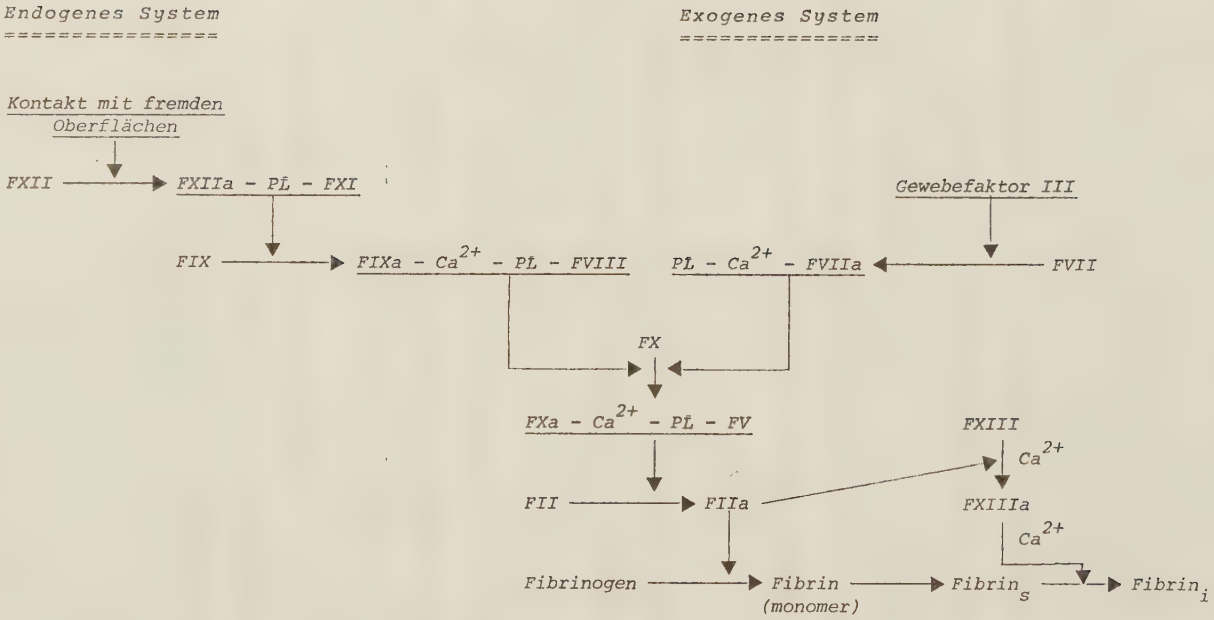


Abb.2: Schematische Darstellung des Gerinnungssystems (PL = Phospholipide).

Dagegen ist der Bildungsort der Faktor-VIII-Aktivität noch nicht sicher bekannt. Möglicherweise werden Faktor-VIII-C und Faktor-VIII-AP nach ihrer Synthese an getrennten Syntheseorten erst im strömenden Blut zum Gesamtmolekül vereint.
Die Synthese von Faktor-VIII-AP und Faktor-VIII-vWF ist autosomal gesteuert, während die Information für Faktor-VIII-C an das X-Chromosom gebunden ist.

1.3. Morphologie der Thrombozyten

Die Thrombozyten zeigen sich im peripheren Blut als scheibenförmige Gebilde mit einem Längsdurchmesser von etwa 2 - 3 um. Ein Zellkern oder DNS-Reste sind nicht anzutreffen. Verteilt im Hyaloplasma finden sich zahlreiche Organellen, die zunächst uniform als Granula bezeichnet werden. Jedes Granulum ist von einer einfachen Membran umgeben.
Für die Thrombozytenfunktion von besonderer Bedeutung sind einerseits die sogenannten alpha-Granula, elektronenoptisch eher hell erscheinende Gebilde, die neben Gerinnungsfaktoren das ß-Thromboglobulin und den Plättchenfaktor 4 enthalten. Andererseits finden sich elektronenoptisch dicht erscheinende Granula, "dense bodies" genannt, die v.a. Ca^{2+}-Ionen, Serotonin, ADP und ATP enthalten. Diese Granula sind die Träger der Freisetzungsreaktion der Thrombozyten.

Mitochondrien sind nur in geringer Zahl im Hyaloplasma anzutreffen. Ribosomen fehlen entsprechend der sehr geringen Protein-Neusynthese der Thrombozyten nahezu vollständig.

Gut ausgeprägt ist dagegen ein System von Mikrotubuli, das beim ruhenden Thrombozyten zirkulär unterhalb der Plasmamembran gelegen ist. Dieses System soll v.a. dem Erhalt der äußeren Form der zirkulierenden Thrombozyten dienen.

Das Hyaloplasma der Thrombozyten ist umgeben von einer typischen dreischichtig aufgebauten Membran. Innerhalb der Membran soll das kontraktile Actomyosin-System lokalisiert sein. Zusätzlich ist auf die Außenseite der Membran eine amorphe Schicht aus Glykoproteinen und Mucopolysacchariden aufgelagert, die als "Plättchenatmosphäre" bezeichnet wurde. In dieser Schicht sind insbesondere Gerinnungsfaktoren (z.B. Fibrinogen, Faktor V und Faktor VIII) adsorbiert. Der Erhalt der Plättchenatmosphäre ist entscheidend für den normalen Ablauf der Thrombozytenaggregation.

Aus Einstülpungen der Thrombozytenmembran ist ein Netz von gewundenen Kanälen aufgebaut, das das Zytoplasma durchzieht und somit eine offene Verbindung zwischen dem Zellinneren und dem umgebenden Milieu herstellt.

Dieses "open-channel"-System soll während der Freisetzungsreaktion der Thrombozyten Substanzen aus den Granula an die Thrombozytenoberfläche schleusen.

Die Thrombozyten entstehen als Abschnürungsprodukte der Megakaryozyten im Knochenmark. Die Lebenszeit im peripheren Blut beträgt etwa 1o Tage. Die Elimination aus dem strömenden Blut findet v.a. in der Milz statt.

1.4. Aggregation und Freisetzungsreaktion der Thrombozyten

Eine Aggregation der Thrombozyten ist durch viele Mediatoren auslösbar. Physiologisch von besonderer Bedeutung sind als Mediatoren v.a. ADP, Adrenalin, Thrombin und Kollagenpolymere.
Die erste Reaktion der Plättchen auf die Mediator-Zugabe (z.B. Thrombin) ist eine Änderung der äußeren Form (Formwandel oder shape change der Thrombozyten). Hierbei verlieren die Plättchen ihre typische Scheibenform und erhalten eine unregelmäßige Gestalt mit ausgeprägter Pseudopodienbildung. Im elektronenmikroskopischen Bild zeigt sich eine Konzentrierung der Organellen im Zentrum, ringförmig umgeben vom System der Mikrotubuli.
Gleichzeitig kommt es zur lockeren Assoziation der Plättchen untereinander. Diese primäre Aggregationswelle

ist prinzipiell reversibel, und die Thrombozyten sind imstande, ihr Ausgangsniveau wiederherzustellen.
Die zweite Aggregationswelle wird ausgelöst durch die gleichzeitig ablaufende Freisetzungsreaktion der Thrombozyten. Aus den im Zentrum lokalisierten Organellen werden Inhaltsstoffe über das "open-channel"-System in das umgebende Plasma abgegeben. Hierbei handelt es sich v.a. um ADP, Serotonin, Adrenalin und Ca^{2+}-Ionen. Gleichzeitig wird der Plättchenfaktor 3 für das plasmatische Gerinnungssystem verfügbar. Das aus endogenen Quellen freigesetzte ADP ist der entscheidende Mediator der sekundären Aggregation, die zu einer raschen Vergrößerung des Thrombozytenpfropfes führt. Die zweite Aggregationswelle und die damit verbundene Freisetzungsreaktion der Thrombozyten sind irreversible Abläufe.
Im elektronenmikroskopischen Bild zeigt sich während dieser Phase eine Schwellung der am Rande des Aggregates liegenden Pseudopodien, während sich zwischen zentral gelegenen Pseudopodien Brücken ausbilden. Gleichzeitig verschmelzen die im Zentrum der Thrombozyten gelegenen Granula miteinander und sind, ebenso wie die "dense bodies", im Endstadium der Aggregation nicht mehr nachweisbar. Das System der Mikrotubuli zerfällt zu Subfilamenten.
Diese Veränderungen sind im lichtmikroskopischen Bild als "visköse Metamorphose" bekannt.

Der beschriebene Funktionsablauf der Thrombozyten (Formwandel ⟶ primäre Aggregation ⟶ sekundäre Aggregation und Freisetzungsreaktion) ist ein aktiver, energiefordernder Prozeß. Zusätzlich ist die Gegenwart von Ca^{2+}-Ionen erforderlich. Lediglich der Formwandel der Thrombozyten ist unabhängig von Ca^{2+}-Ionen.

Eine wesentliche Rolle für die Freisetzungsreaktion und die sekundäre Aggregation der Thrombozyten kommt dem Prostaglandinsystem zu. Als Vorläufersubstanz dient die Arachidonsäure (5, 8, 11, 14 - Eicosa - tetraen - säure = $C_{20}H_{32}O_2$), eine vierfach ungesättigte Fettsäure auf der Basis einer C_{20}-Kohlenstoffkette mit einem Molekulargewicht von 3o4,5 Daltons.
Arachidonsäure ist,gebunden an Phospholipide, in der Thrombozytenmembran fixiert. Da nur die freie Arachidonsäure zur Prostaglandinsynthese genutzt werden kann, muß diese zunächst mit Hilfe einer Phospholipase von den Lipidanteilen abgetrennt werden.
Die Arachidonsäure wird dann mit Hilfe des Enzyms Cyclooxygenase in labile zyklische Endoperoxide überführt. Aus diesen entsteht das Thromboxan A_2, das die Aggregations- und Freisetzungsreaktion der Thrombozyten auslöst und rasch in das unwirksame Thromboxan B_2 zerfällt.

Als Gegenspieler wird in der Wandung von Arterien und Venen das Prostazyklin gebildet, ein starker Hemmer der Thrombozytenaggregation.
Die Wirkung des Enzyms Cyclooxygenase ist durch Acetylsalicylsäure spezifisch hemmbar, worauf die aggregationshemmende Wirkung dieser Substanz beruht.

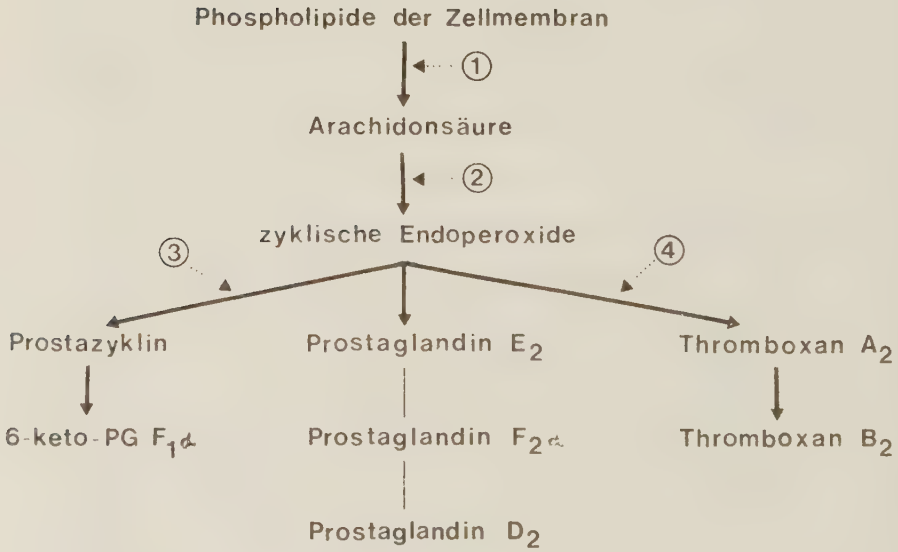


Abb.3: Schematische Darstellung der Prostaglandinsynthese.
(1) Phospholipase
(2) Cyclooxygenase
(3) Prostazyklin-Synthetase
(4) Thromboxan-Synthetase

Eine Sonderstellung nimmt die Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation ein.
Ristocetin ist ein Antibiotikum aus Nocardia lurida, das wegen seiner ausgeprägten thrombopenischen Wirkung als Therapeutikum ausgeschieden ist. Es löst in einem weiten Konzentrationsbereich eine Thrombozytenaggregation in normalem, plättchenreichem Plasma aus. Die Aggregation ist in niedrigen Dosen stets biphasisch. Hierbei ist die primäre Aggregationswelle unabhängig von der Stoffwechselaktivität der Plättchen. Sie läuft auch in Ca^{2+}-freiem Milieu und bei thrombasthenischen Plättchen ungestört ab. Es handelt sich also nicht um eine Vitalreaktion der Thrombozyten, sondern um eine passive Thrombozytenagglutination.
Die zweite Aggregationswelle ist allerdings abhängig von der endogenen ADP-Freisetzung und somit z.B. durch Acetylsalicylsäure hemmbar.
Die Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation ist abhängig von der Anbindung des Faktor-VIII-vWF an die Thrombozytenoberfläche. Plasmafrei gewaschene Thrombozyten geben ohne Faktor-VIII-Zugabe mit Ristocetin keine Aggregationsreaktion. Auch bei Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung fällt aus diesem Grund die die Reaktion pathologisch aus.

1.5. Fragestellung der Arbeit

Zielsetzung der Arbeit ist es, an einem größeren Patientenkollektiv mit gesicherter von-Willebrand-Erkrankung zunächst die diagnostische Wertigkeit der routinemäßig bestimmten Laborparameter zu überprüfen. Weiterhin soll der Stellenwert der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation im Formenkreis der von-Willebrand-Erkrankung und der Thrombopathien allgemein untersucht werden. Insbesondere stellt sich die Frage, ob die zusätzliche Austestung der Arachidonsäure-induzierten Aggregation bei den verschiedenen Thrombopathien eine Aussage ermöglicht, die über den Rahmen der bisher zur Verfügung stehenden Thrombozytenfunktionstests hinausreicht.

Mit der zusätzlichen Überprüfung des Wanderungsverhaltens des Faktor-VIII-Moleküls soll der Frage nachgegangen werden, ob die in der Literatur beschriebene abnorme Beweglichkeit des Moleküls einen Ausnahmefall auch bei der von-Willebrand-Erkrankung darstellt, oder ob es sich hierbei um einen häufigen Befund mit hoher diagnostischer Wertigkeit handelt.

Abschließend soll anhand der genetischen Daten der Patienten die Penetranz und Expressivität der Erkrankung in unserem Patientengut dargestellt werden.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Patientenkollektiv

Das Patientengut bestand aus insgesamt 52 Patienten mit nachgewiesener von-Willebrand-Erkrankung. Diese entstammten einerseits aus vier Großfamilien, deren genetische Daten unten aufgeführt sind, andererseits waren es Einzelfälle oder kleine Familienverbände.
Bei den Untersuchungen handelte es sich überwiegend um Kontrolluntersuchungen bei bereits vorher bekanntem Krankheitsbild, in einigen Fällen wurde die Diagnose allerdings erstmalig im Verlauf dieser Untersuchungen gestellt.
Insgesamt entfielen auf die 52 Patienten 78 einzelne Untersuchungstermine, da ein Teil der Patienten ein zweites Mal untersucht werden konnte.

Es wurden folgende Routineparameter ermittelt:

1) Blutungszeit
2) Faktor-VIII-Aktivität (F-VIII-C)
3) Faktor-VIII-assoziiertes Protein (F-VIII-AP)
4) Thrombozytenretention
5) Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation

Auf die Bestimmung des Ristocetin-Cofaktors wurde wegen der starken Streuung der einzelnen Meßwerte verzichtet, zumal bereits die Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation ein sehr gutes Ergebnis mit hoher Sicherheit in der Diagnosestellung zeigte.

Als beweisend für die Diagnose der von-Willebrand-Erkrankung wurde folgende Konstellation angesehen:

Bei positiver Blutungsanamnese und/oder Familienanamnese müssen mindestens zwei der o.g. Parameter im typischen Sinne pathologisch verändert sein.

Mit Absicht wurden auch Patienten mit einem blanden Krankheitsbild in die Studie miteinbezogen, da gerade hier die Aussagekraft der einzelnen diagnostischen Parameter am besten beurteilt werden kann.

Die oben aufgestellten Kriterien hinsichtlich der Diagnosestellung wurden von zwei Patienten allerdings nicht vollständig erfüllt. Wegen der positiven Blutungsanamnese und der sehr klaren Familienanamnese wurden diese dennoch in die Untersuchung miteinbezogen. Sie sind in der Übersicht mit § gekennzeichnet.

2.2. Bestimmung der subaqualen Blutungszeit

Bei der Bestimmung der subaqualen Blutungszeit wird mit einer Kapillarlanzette eine Läsion an der Fingerkuppe gesetzt. Der erste austretende Bluttropfen wird abgewischt und dann der Finger in o,9%ige NaCl-Lösung, die auf +37°C erwärmt ist, eingetaucht. Das aus der Läsion austretende Blut rieselt in Form eines gut sichtbaren Blutfadens herab. Gemessen wird mit einer Stoppuhr die Zeit vom Eintauchen des Fingers bis zum plötzlichen Abreißen des Blutfadens.
Die Blutungszeit ermöglicht eine Abschätzung der Funktionstüchtigkeit des thrombozytären und des vasogenen Hämostasesystems. Defekte des plasmatischen Gerinnungssystems führen nicht zu einem pathologischen Ausfall der Blutungszeit.

Normalwert: $\leq$ 24o sec.

2.3. Thrombozytenzählung und Messung der Thrombozytenretention

Zur Thrombozytenzählung wurde Venenblut in EDTA-beschichteten Röhrchen (Fa. Greiner, Nürtingen) aufgefangen.
Die Bestimmung erfolgte direkt aus dem Vollblut mit Hilfe eines elektronischen Partikelzählgerätes der Firma Coulter

(Model S Plus). Das Gerät arbeitet nach dem Prinzip der Widerstandsmessung. Hierbei wird die verdünnte Blutprobe durch eine kapilläre Öffnung gesaugt, an die eine elektrische Spannung angelegt ist. Die zellulären Partikel bewirken beim Durchtritt durch die Kapillaröffnung eine plötzliche Widerstandsänderung, die vom Gerät als Impuls erkannt wird. Die Höhe des Impulses ist der Größe der Partikel proportional. Mit Hilfe eines Computerteils wird aus der Summe der Impulse die Thrombozytenzahl errechnet.
Vor jeder Meßserie wurden aus o,9%iger NaCl-Lösung zwei Leerwerte gemessen, um Verunreinigungen und andere Störungen des Systems auszuschließen.
Zusätzlich wurde die Richtigkeit der Messung mit Hilfe von kommerziellen Standard-Thrombozyten überprüft.

Die Bestimmung der Thrombozytenretention erfolgte aus Nativblut nach der Methode Hellem II mit einem kommerziell erhältlichen Glasperlenschlauch (ThromboScreen Rot; Fa. Systron, Wiesbaden). Hierbei finden PVC-Schläuche mit einem Innendurchmesser von 2,o mm Verwendung, die mit 1,o Gramm gewaschener Glasperlen mit einem Durchmesser von o,3 mm gefüllt sind. Über ein Dauerinfusionsgerät (Perfusor V; Fa. Braun Melsungen AG) wird ein

gleichmäßiger Durchfluß (3,3 ml/Minute) und damit eine konstante Kontaktzeit (12 Sekunden) des Blutes erzeugt. Das Blut wird nach der Passage in EDTA-Röhrchen aufgefangen und daraus die Thrombozytenzahl bestimmt. Die Berechnung der Thrombozytenretention in Prozent erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Retention (\%)} = \frac{\text{Thrombo 1} - \text{Thrombo 2}}{\text{Thrombo 1}} \times 100$$

(Thrombo 1 = Thrombozytenzahl vor Passage
Thrombo 2 = Thrombozytenzahl nach Passage)

Normalwert: $\geq 85\%$

Ein pathologischer Ausfall der Thrombozytenretention findet sich außer bei der von-Willebrand-Erkrankung auch bei der hereditären Thrombasthenie Glanzmann sowie bei erworbenen Thrombozytenfunktionsstörungen. Thrombozytenaggregationshemmer (z.B. Acetylsalicylsäure) führen dagegen nicht zu einem pathologischen Ausfall der Thrombozytenretention.

2.4. Gewinnung von PRP und PAP

Für die Gerinnungsanalysen wurde Venenblut verwandt, das im Verhältnis 1:1o mit Citrat-Pufferlösung (Fa. Behring, Marburg) gemischt war. Die gepufferte Citratlösung hat einen pH-Wert von 4,5 und ist blutisoton. Im 1:1o verdünnten Plasma stellt sich ein pH-Wert von 7,2 bis 7,4 ein, der damit etwa den physiologischen Verhältnissen entspricht, durch Verlust von CO_2 aber zunehmend in den alkalischen Bereich abdriftet. Ungepufferte Citratlösung erzeugt dagegen im 1:1o verdünnten Plasma bereits initial einen pH-Wert von 7,8 bis 8,o.
Die Herabsetzung des pH-Wertes durch die Citrat-Pufferlösung soll insbesondere die Gerinnungsfaktoren V und VIII vor rascher Inaktivierung schützen. Auch bei der Diagnostik der Thrombozytenfunktion ist die Aufrechterhaltung eines physiologischen pH-Wertes von erheblicher Bedeutung, da der Erhalt der Thrombozytenfunktion u.a. deutlich pH-abhängig ist (3o).

Zur Herstellung des plättchenreichen Plasmas (PRP) wurden die Blutproben in einer konventionellen Labor-Kühlzentrifuge (Rotixa K; Fa. Hettich) 15 Minuten bei 5oo x g zentrifugiert. Nach Abheben des PRP wurden die Proben

15 Minuten bei 3.000 x g zur Herstellung von plättchenarmem Plasma (PAP) nachzentrifugiert.

Für die Thrombozytenaggregationstests wurde das plättchenreiche Plasma durch Vermischung mit Patienten-eigenem plättchenarmem Plasma auf eine konstante Thrombozytenzahl von 150.000/µl eingestellt.

Für die Bestimmung des Faktor-VIII-assoziierten Proteins und für die zweidimensionale immunelektrophoretische Auftrennung des Faktor-VIII-Moleküls wurden Proben bei -30°C eingefroren und so bis zur Durchführung der Tests gelagert.

2.5. Thrombozytenaggregationsstudien

Die Bestimmung der induzierten Thrombozytenaggregation erfolgte nach dem Prinzip von BORN (3). Hierbei wird PRP in einer Meßküvette im Strahlengang eines Photometers mittels eines Rührmagneten kräftig gerührt. Nach Zugabe des Testreagenz (Kollagen, Arachidonsäure oder Ristocetin) erfolgt eine rasche Aggregation der Thrombozyten untereinander. Die hierbei auftretende Zunahme der Lichttransmission wird photometrisch gemessen und kontinuierlich über einen angeschlossenen Schreiber registriert.

Für die Untersuchungen stand ein Zwei-Kanal-Aggregometer (Fa. LAbor, Hamburg) mit angeschlossenem Zwei-Kanal-Schreiber (Fa. Kipp & Zonen, Typ BD 41) zur Verfügung. Als Reaktionstemperatur wurde 37°C gewählt, die Drehgeschwindigkeit des Rührmagneten betrug 1.000 U/min. Benutzt wurde PRP mit einer konstanten Thrombozytenzahl von 150.000/µl, dessen Herstellung bereits beschrieben wurde. Das Plasma wurde vor der Messung exakt 8 Minuten im Thermoblock des Gerätes vorinkubiert, um eine sichere Erwärmung auf 37°C zu gewährleisten. Nach einer Vorlaufzeit von 3 Minuten erfolgte dann die Zugabe des Testreagenz.

Folgende Testsubstanzen wurden benutzt:

Ristocetin (Ristocetin-sulphate; Lundbeck & Co. A/S-Copenhagen)

Auflösung und Verdünnung in Diäthylbarbiturat-Acetat-Puffer, pH 7,6 (Fa. Behring, Marburg)

Testansatz: 450 µl PRP + 50 µl Ristocetin-Lösung

Endkonzentrationen: 1,0 bzw. 1,2 mg/ml Plasma (z.T. zusätzlich 1,4 und 1,6 mg/ml)

Kollagen (Kollagenreagenz Horm; Hormon-Chemie, München)

Verdünnung im Originalpuffer des Herstellers

Testansatz: 500 µl PRP + 10 µl Kollagen-Reagenz

Endkonzentrationen: 1,0 bzw. 2,0 µg/ml Plasma

Arachidonsäure (Natrium-Arachidonat, Reinheitsgrad 9o% Sigma Chemical, St. Louis)

Auflösung und Verdünnung in o,9%iger NaCl-Lösung

Testansatz: 45o µl PRP + 5o µl Testreagenz

Endkonzentration: 6 x $1o^{-4}$ mol (Routineansatz)

Die Arachidonsäure-Lösung ist klar durchscheinend. Der pH-Wert liegt mit 9,4 stark im alkalischen Bereich. Beim Versuch, den pH-Wert auf einen physiologischen Bereich von 7,4 einzustellen, tritt eine weißliche Trübung der Lösung ein. Dies entspricht auch den Befunden von SILVER und Mitarbeitern (33).
Wir haben aus diesen Gründen auf eine Änderung der pH-Verhältnisse verzichtet und die Arachidonsäure-Lösung unverändert für den Test benutzt. Wegen der Pufferung der Plasmaproben erschien dieses Vorgehen unproblematisch.

In einem Vorversuch wurde zu 45o µl Plasma eine steigende Menge Arachidonsäure-Lösung (maximal 2oo µl) gegeben. Hierbei konnte eine Verschiebung des pH-Wertes in der Probe nicht beobachtet werden.

Die Eichung des Aggregometers erfolgte über ein Standardfilter. Hierbei wurde die Transmission des Filters als O% festgelegt, die Transmission der Leerküvette entsprach dann 1oo%.

Aus den Aggregationskurven wurden folgende Meßgrößen ermittelt:

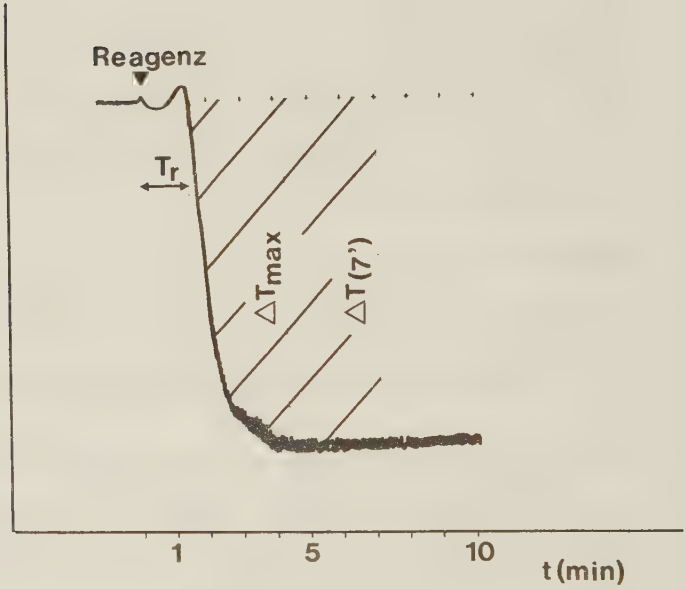


Abb.4: Beispiel: Kollagen-induzierte Aggregation (Erklärung der Abkürzungen im Text)

T_r = Reaktionszeit
(Zeit von der Zugabe des Testreagenz bis zum Abschluß des Formwandels, d.h. bis zum Beginn der Aggregationsreaktion)

ΔT_{max} = maximaler Transmissionsunterschied

ΔT (6' o. 7') = Transmissionsunterschied 6 bzw. 7 Minuten nach Zugabe des Testreagenz

Eine eventuelle sekundäre Desaggregation wurde nach folgender Formel quantifiziert:

$$\text{Desaggregation (\%)} = \frac{\Delta T_{max} - \Delta T\,(6')}{\Delta T_{max}} \times 100$$

Zusätzlich wurde die Fläche zwischen der Horizontalen, der Aggregationskurve und ΔT (6' o. 7') mit Hilfe eines Planimeters (Kompensations-Polar-Planimeter, No. 313 E; Fa. Haff, Pfronten) ausgemessen. Diese Größe (in der obigen Abbildung schraffiert wiedergegeben) gibt sowohl die Kinetik als auch das Ausmaß der Aggregationsreaktion wieder.

Die oben aufgeführten Meßgrößen fanden aber lediglich bei den Voruntersuchungen über die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit sowie die Reproduzierbarkeit der Aggregationsreaktionen Verwendung. Von einer Übernahme in die Routinetests wurde abgesehen, da Änderungen der

Reaktionskinetik, die insbesondere für die Beurteilung der Ristocetin-induzierten Aggregation wesentlich sind, sich in den Meßgrößen nur unvollkommen wiederspiegeln. Die beträchtliche Streuung der Meßwerte zwischen verschiedenen Probanden erschwert zusätzlich die zahlenmäßige Auswertung.

Die Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation wurde zusätzlich auch durch folgende Methode abgeschätzt: In ein Kunststoffröhrchen wird unverdünntes PRP pipettiert und mit Ristocetinlösung versetzt. Das Röhrchen wird dann mit einem Stopfen verschlossen und 6 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rollmischer (Ten Roller Mixer, Model A 258; Fa. Denley) gemischt. Auch unter diesen Bedingungen kommt es zur raschen Aggregation, die makroskopisch gut verfolgt werden kann. Nach Ablauf der Aggregationsreaktion wird ohne zeitliche Verzögerung die Thrombozytenzahl aus der aggregierten Probe mit Hilfe des Partikelzählgerätes ermittelt. Bei bekannter Thrombozytenzahl im Ausgangsplasma erfolgt die Abschätzung der Aggregation analog zur Bestimmung der Thrombozytenretention nach folgender Formel:

$$\text{Aggregation (\%)} = \frac{\text{Thrombo 1} - \text{Thrombo 2}}{\text{Thrombo 1}} \times 100$$

(Thrombo 1 = Thrombozytenzahl im Ausgangsplasma
Thrombo 2 = Thrombozytenzahl nach Aggregation)

Testansatz: 1.150 µl PRP + 100 µl Ristocetin-Lösung

Endkonzentrationen: 1,0 bzw. 1,2 mg/ml Plasma

2.6. Bestimmung der Faktor-VIII-Aktivität

Die Bestimmung der Faktor-VIII-Aktivität erfolgte im Einphasentest nach LANGDELL (28). Hierbei wird das zu untersuchende Plasma in einer geeigneten Verdünnung mit Faktor-VIII-Mangelplasma (Restaktivität $\leq$ 1%) versetzt. Durch Zugabe von Phospholipiden und Kaolin als Oberflächenaktivator wird das endogene Gerinnungssystem maximal aktiviert. Nach einer konstanten Inkubationszeit wird durch Zugabe von Calciumchlorid die Gerinnung ausgelöst. Gemessen wird die Gerinnungszeit mit Hilfe eines Schnitger und Gross-Koagulometers.

Materialien:

Reagenzien zur Bestimmung der Gerinnungsfaktoren VIII und IX (Fa. Behring, Marburg)

Diäthylbarbiturat-Acetat-Puffer, pH 7,6 zur Verdünnung der Proben

Durchführung:

1) Ein Reagenzröhrchen wird beschickt mit

   100 µl verdünnte Plasmaprobe

   100 µl F-VIII-Mangelplasma

   100 µl PTT-Reagenz

2) Inkubation exakt 6 Minuten bei 37°C

3) Zugabe von

   100 µl $CaCl_2$-Lösung (0,025 mol)

4) Messung der Gerinnungszeit

Die Gerinnungszeiten einer Verdünnungsreihe mit Standard-Human-Plasma werden auf doppelt-logarithmischem Papier der Faktor-VIII-Aktivität, ausgedrückt in Prozenten, zugeordnet. Aus dieser Bezugskurve werden dann die den Gerinnungszeiten entsprechenden Aktivitätswerte der Patientenplasmen abgelesen. Liegt der Meßwert außerhalb der Bezugskurve, wird die Bestimmung aus einer konzentrierteren bzw. stärker verdünnten Probe wiederholt.

Normalwert: ≥70%

2.7. Bestimmung des Faktor-VIII-assoziierten Proteins

Die Bestimmung des Faktor-VIII-AP erfolgte mit der Technik des Elektro-Immuno-Assay nach LAURELL (20).

Hierbei werden die zu untersuchenden Proben in kathodennahe Auftragstellen eines Agarosegels eingefüllt, das mit einem spezifischen Antikörper gegen Faktor-VIII-AP versetzt ist. Die Antigene wandern im elektrischen Feld anodenwärts. Beim Erreichen des Äquivalenzpunktes zwischen Antigen und Antikörper bilden sich Immun-Komplexe, die ein typisches flammenförmiges Präzipitat erzeugen. Die Höhe der Immunkomplex-Peaks ist der Antigen-Konzentration proportional. Zur Erstellung einer Bezugskurve dient eine geometrische Verdünnungsreihe eines Normalplasmas.

Materialien:

Elektrophorese-Einrichtung LKB 2117 Multiphor mit LKB 2121 Power supply

Indubiose A 37 (Industrie Biologique Francaise, Genevillier's)

Barbital-Na_2EDTA-Puffer, pH 8,6

Clotimmun-AHG-assoziiertes Protein (Antiserum vom Kaninchen; Fa. Behring, Marburg)

Coomassie Brilliant Blue R-Färbelösung

(4,5 l Äthanol 96%ig
4,5 l dest. Wasser
1,o l Eisessig
5o g Coomassie Brilliant Blue R)

Entfärbelösung für Coomassie-Färbung

(4,5 l Äthanol 96%ig

4,5 l dest. Wasser

1,o l Eisessig)

Durchführung:

In 1oo ml Barbitalpuffer wird 1 g Agarose eingewogen und bei +1oo°C gelöst. Nach Abkühlung der Agarose auf +52°C werden 8oo µl des spezifischen Antiserums zugegeben (Endkonzentration o,8% v/v). Etwa 3o ml der antiserumhaltigen Agarose werden dann zwischen zwei 1o x 2o cm große Glasplatten pipettiert, die durch einen U-Rahmen und Bulldog-Klemmen fixiert sind. Es resultiert ein Gel mit einer gleichmäßigen Schichtdicke von 1,5 mm. Nach Erstarren des Gels wird die obere Glasplatte vorsichtig abgehoben und die Gelgrenzen mit einer Schneideklinge begradigt.

Auf der kathodennahen Seite werden mit Hilfe einer Schablone und einer 2,5 mm Teleskopstanze eine Reihe von runden Auftragstellen gestanzt. Die Gelplatte wird auf den Kühltisch der Elektrophoreseapparatur gelegt und der Kontakt zwischen dem Gel und den Puffertrögen mit bündig geschnittenen Filterpapierstreifen, die in Barbitalpuffer getaucht sind, hergestellt.

Probevolumen: 5 µl

Feldstärke: 3 - 4 V/cm

Temperatur: 18°C

Laufzeit: 18 Stunden

Nach Beendigung des Laufes werden die Gele mit einer Lage dicken Filterpapierts abgedeckt und unter dem Luftstrom eines Föhns getrocknet. Durch dreimalige Wässerung in dest. Wasser werden anschließend die nicht gebundenen Proteine entfernt und die Gele danach erneut getrocknet. Die trockenen Gele werden 6o Minuten in Coomassie Blue gefärbt und anschließend die nicht proteingebundene Farbe mit Entfärbelösung nach Sicht entfernt.

Gemessen wird mit Millimeterpapier die Strecke zwischen der Auftragstelle und dem oberen Rand des Präzipitats. Für die Bestimmung der Bezugskurve wurde ein Tischrechner (Hewlett Packard, Nr. 983o) benutzt. Zugrundegelegt wurde ein Polynom dritten Grades $y = a + bx + cx^2 + dx^3$, *wobei die Präzipitatlangen des Standards als X- und die zugehörigen Relativprozente als Y-Werte eingegeben wurden. Nach Bestimmung der Konstanten a, b, c, d, wurden die Peaklängen von unbekannten Proben nach obiger Formel in Relativprozente umgerechnet.*

Ergaben sich Präzipitatlängen, die außerhalb der Werte des Referenzplasmas lagen, wurde die Bestimmung konzentrierter bzw. stärker verdünnt wiederholt.

Normalwert: > 70%

2.8. Zweidimensionale Immunelektrophorese des Faktor-VIII-Moleküls

Von einer schlitzförmigen Auftragstelle aus werden die zu untersuchenden Proben im antikörperfreien Agarosegel in der Primärphase aufgetrennt. Nach Abschluß der Primärauftrennung wird ein etwa 1 cm breiter Streifen aus dem Gel herausgetrennt, der Gelstreifen wird um 90^{o} gedreht und ein antiserumhaltiges Sekundärgel angegossen. Bei der Sekundärauftrennung kommt es am Äquivalenzpunkt zwischen Antigen und Antikörper zur Präzipitation von Immunkomplexen. Die Präzipitate erscheinen als breit ausgeprägte Peaks, wobei die Höhe des Peaks der Konzentration des Antigens entspricht. Die Breite des Peaks ist Ausdruck der Homogenität bzw. Heterogenität des Proteins.
Zur exakten Abschätzung des Wanderungsverhaltens des Faktor-VIII-Moleküls wurde neben dem Antiserum gegen Faktor-VIII-AP auch Antiserum gegen alpha-1-Antitrypsin

zugegeben. Es resultieren also zwei räumlich getrennte Peaks. Hierbei dient alpha-1-Antitrypsin als Markerprotein der Auftrennung.

Materialien:

Electrophoresis cell, Model 1415; Fa. Bio-Rad

Electrophoresis constant power supply ECPS 2000/300; Fa. Pharmacia

Kaninchen-Antiserum gegen Human-alpha-1-Antitrypsin Fa. Behring

übrige Reagenzien wie unter 2.7.

Durchführung:

In 100 ml Barbitalpuffer wird 1 g Agarose eingewogen und bei +100°C gelöst. Nach Abkühlung der Agarose auf etwa +70°C werden 20 ml auf einem Horizontaltisch auf eine Glasplatte (90 x 110 mm) ausgegossen. Es resultiert ein Gel mit einer gleichmäßigen Schichtdicke von 2 mm. Noch bevor das Gel erstarrt ist, werden mit einem Rechen 5 Auftragschlitze (14 x 1,8 mm) in das Gel gestanzt. Nach vollständiger Abkühlung des Gels wird der Stanzrechen vorsichtig entfernt.

Die Gelplatten werden dann auf Kunststoffbrücken gelegt, deren senkrechte Anteile mit einem 1,5%igen (w/v) Agarosegel gefüllt sind. Mit demselben Gel wird der Kontakt

zu den Glasplatten hergestellt. Der Kontakt zwischen der Trennfläche und den Puffertrögen ist also hier nicht über Filterpapierstreifen, sondern über eine Gel-Brücke hergestellt.

Probevolumen: 5o µl
Feldstärke: 5 V/cm
Temperatur: 18°C
Laufzeit: 4 Stunden

Nach Beendigung der Primärauftrennung wird mit einer Schneideklinge ein etwa 1 cm breiter Streifen aus dem Gel herausgetrennt und die übrige Gelmenge verworfen. Der Gelstreifen wird mit einem Messingblock vorsichtig um 9o° auf der Platte gedreht. Anodenwärts wird dann 15 ml antikörperhaltiges Gel (o,8%iges v/v Anti-Faktor-VIII-AP-Serum + 3,5%iges v/v Anti-alpha-1-Antitrypsin-Serum) angegossen. Der Kontakt zwischen Trennfläche und Puffertrögen wird erneut über eine Gelbrücke mit 1,5%igem Agarose-Gel hergestellt.

Feldstärke: 1,5 V/cm
Temperatur: 18°C
Laufzeit: 18 Stunden

Die weitere Aufarbeitung entspricht dem Vorgehen beim Elektro-Immuno-Assay nach LAURELL.

3. ERGEBNISSE

3.1. Überblick über die diagnostischen Routineparameter

Abb.5 gibt die Befunde, nach den einzelnen Parametern geordnet, wieder.

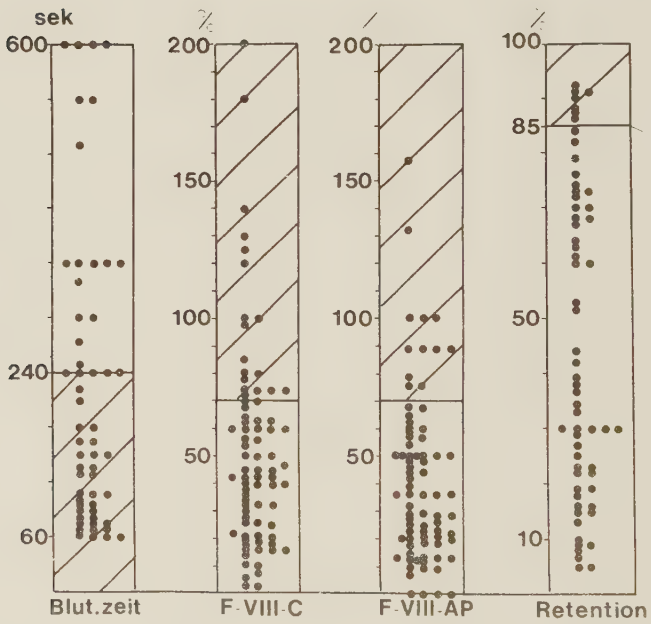


Abb.5: Untersuchungsergebnisse bei 52 Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung (insgesamt 78 Einzeluntersuchungen)
(Normalbereich jeweils schraffiert wiedergegeben)

Die persönlichen Daten der untersuchten Patienten und die Ergebnisse der Routineuntersuchungen sind in Tab.1 zusammengefaßt.

Im Folgenden soll die Aussagekraft der einzelnen diagnostischen Parameter besprochen werden.

3.1.1 Blutungszeit

Eine pathologische Blutungszeit fand sich bei insgesamt 55 Untersuchungsterminen lediglich in 17 Fällen (≙ 31%). Bei weiteren 5 Patienten lag der Wert an der oberen Normgrenze. Insgesamt fand sich also bei etwa 2/3 aller Patienten eine normale Blutungszeit.

3.1.2 Faktor-VIII-Aktivität

Bei insgesamt 78 Untersuchungsterminen fand sich 58-mal (≙ 74%) eine pathologische Faktor-VIII-Aktivität. Darunter befinden sich allerdings 11 nur knapp pathologische Werte im Bereich zwischen 6o und 7o% der Norm.

lfd.Nr.	Alter/Geschl.	Blut.Zeit	F-VIII-C	F-VIII-AP	Retention	Risto-Aggregation 1,o	1,2	1,4	1,6
Sippe K.									
1)	49 J. w	24o	4o	21	7o	path.	path.	o.B.	o.B.
2)	46 J. m	8o	6o	19	42		path.		
	Bruder zu 1)		5o	25	68	path.	path.		
3)	18 J. w	75	7o	14			path.		
	Tochter zu 2)	6oo	32	13	16	path.	path.	o.B.	o.B.
4)	16 J. w	18o	6o	5o			path.		
	Tochter zu 2)								
5)	42 J. w	165	4o	5o			path.		
	Kousine zu 1) u. 2)								
6)	19 J. m	9o	63	48			path.		
	Sohn zu 5)								
7)	14 J. m	135	85	48			path.		
	Sohn zu 5)								
8)	43 J. w	75	42	27			o.B.		
			7o	23	18	o.B.	o.B.		
9)	15 J. m	95	21	2o			path.		
	Sohn zu 8)		45	2o	64	o.B.	o.B.		
1o)	11 J. w	6o	14	13			path.		
	Tochter zu 8)		32	13	72	o.B.	o.B.		

lfd.Nr.	Alter/Geschl.	Blut.Zeit	F-VIII-C	F-VIII-AP	Retention	Risto-Aggregation 1,o	1,2	1,4	1,6
Sippe D.									
11)	42 J. w		12o	5o	27	path.	path.		
12)	12 J. w Tochter zu 11)	54o	54	5o	44				
13)	38 J. w	1oo	64	5o	67	path.	path.		
	Schwester zu 11)		78	44	8	path.	path.	path.	path.
14)	16 J. m	11o	42	28	6o	path.	path.		
	Sohn zu 13)		38	9	33	path.	path.		
15)	33 J. w Schwester zu 11)	7o	68	36	16	path.	o.B.		
16)	16 J. w Tochter zu 15)	75	32	28	9				
17)	13 J. m Sohn zu 15)	6o	36	36	53	path.	path.		
18)	8 J. m Sohn zu 15)	135	72	36	88	path.	o.B.		
19)	28 J. m Bruder zu 11)	49o	6o	42	3o	path.	path.		

lfd.Nr.	Alter/Geschl.	Blut.Zeit	F-VIII-C	F-VIII-AP	Retention	Risto-Aggregation 1,o	1,2	1,4	1,6
2o)	44 J. m	18o	18o	132	23				
		24o	8o	89	1o	path.	path.		
21)	17 J. w	24o	13o	1oo	25				
	Tochter zu 2o)	6oo	1oo	68	15	path.	path.	o.B.	o.B.
22)	14 J. m	36o	26	32	3o	path.	path.		
23)	82 J. m		1o	0		path.	path.		
			1o	0	37	path.	path.		
24)	26 J. w	11o	74	58	6o	path.	o.B.		
			56	57		o.B.	o.B.		
25)	19 Mon. m		98	6o	13	o.B.	o.B.		
	Sohn zu 24)		8o	76	15	path.	path.		
26)	52 J. w	13o	125	6o	86	path.	o.B.		
	Mutter zu 24)								
27)	24 J. w		6o	39					
		36o	1oo	29	82				
28)	32 J. m	24o	56	79		path.	path.		
			45	157	7o	path.	path.		
29)	17 J. m	36o	16	19			path.		
3o)	43 J. w	15o	14o	5o	76	path.	o.B.	o.B.	

lfd.Nr.	Alter/Geschl.	Blut.Zeit	F-VIII-C	F-VIII-AP	Retention	Risto-Aggregation 1,o	1,2	1,4	1,6
31)	17 J. m	21o	62	5o	3o		path.	path.	path.
	Sohn zu 3o)		4o	46	22	path.	path.		
32)	45 J. m	7o	16	13	34	path.	path.		
		15o	16	9		path.	path.	path.	
33)	18 J. w	8o	2o	12	19	path.	path.		
		24o	26	1o	61	path.	path.	path.	
34)	32 J. m		5o	36	87				
		9o	3o	29	84				
35)	35 J. m	6o	33	64	74	o.B.	o.B.		
36)	6 J. w		3	7		path.	path.		
			3	11	o	path.	path.		
37)	39 J. w		2oo	54	68	o.B.	o.B.		
	Mutter zu 36)								
38)	37 J. w	13o	6o	62	91	o.B.	o.B.		
			42	44	91	o.B.	o.B.		
39)	5 J. m	15o	19	1oo	9o	path.	path.		
	Sohn zu 38)		17	56	63				
4o)	27 J. m		2o	89	92	path.	o.B.		
	Bruder zu 38)		16	68	73	o.B.	o.B.		
41)	42 J. m	22o	21	19	22	path.	path.	path.	path.

lfd.Nr.	Alter/Geschl.	Blut.Zeit	F-VIII-C	F-VIII-AP	Retention	Risto-Aggregation 1,o	1,2	1,4	1,6
42)	12 J. w Tochter zu 41)	7o	25	13	79	path.	path.	o.B.	o.B.
43)	43 J. w	6oo	6	O			path.		
		6oo	7	O	3o	path.	path.		path.
44)	23 J. m	11o	74	22	39				
		95	18	23	38	path.	path.		
45)	4o J. w	34o	5o	1oo	23				
		28o	74	88	9	path.	path.	path.	o.B.
46)	13 J. m	54o	44	88	5	path.	path.		
	Sohn zu 45)	25o	6o	76	5	path.	path.	o.B.	o.B.
47)	36 J. w	36o	28	22	7	path.	path.		
48)	22 Mon. m	36o	21	26	3o				
Sippe H.									
49)	42 J. m	165	42	2o	19	path.	path.	path.	path.
5o)	11 J. m Sohn zu 49)	3oo	63	25	73	path.	path.	path.	path.

lfd.Nr.	Alter/Geschl.	Blut.Zeit	F-VIII-C	F-VIII-AP	Retention	Risto-Aggregation 1,o	1,2	1,4	1,6
51)	1o J. w Tochter zu 49)	6o	46	2o	52	path.	path.	path.	path.
52)	3 J. m Sohn zu 49)	3oo	74	35	29	path.	o.B.	o.B.	o.B.
m = männlich, w = weiblich									
	Normalwerte:	24o	7o	7o	85				

Tab.1: Persönliche Daten und Untersuchungsergebnisse bei 52 Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung.

3.1.3 Faktor-VIII-assoziiertes Protein

Eine Erniedrigung des Faktor-VIII-AP fand sich bei insgesamt 78 Untersuchungsterminen 66-mal (≙ 85%). Darunter befanden sich 6 Fälle mit nur knapp pathologischen Werten zwischen 6o und 7o% der Norm.

3.1.4 Thrombozytenretention

Bei insgesamt 62 Untersuchungsterminen fand sich 55-mal (≙ 89%) ein pathologischer Ausfall der Thrombozytenretention. Hierbei war nur in zwei Fällen ein knapp pathologisches Ergebnis (8o - 85% der Norm) festzustellen.

3.1.5 Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation

Der Ablauf der Aggregationsreaktion ist bei der Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation deutlich dosisabhängig. Bei einer hohen Testdosis (z.B. 1,6 mg/ml) findet sich eine monophasische, irreversible Aggregation. Mit der Verringerung der Testdosis bildet sich zunehmend ein biphasischer Verlauf heraus. Es verbleibt schließlich eine mäßig ausgeprägte

primäre, reversible Aggregationswelle. Bei einer weiteren Erniedrigung der Testdosis fällt die Reaktion dann negativ aus.
Die Konzentrationsabhängigkeit der Reaktion ist beispielhaft in Abb.6 wiedergegeben.

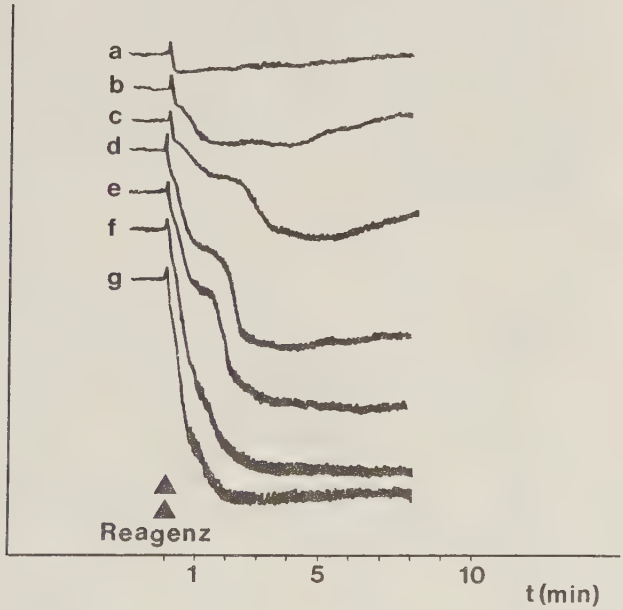


Abb.6: Konzentrationsabhängigkeit der Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation in einem typischen Beispiel.
(a = o,6 mg/ml; b = o,8 mg/ml; c = o,9 mg/ml; d = 1,o mg/ml; e = 1,2 mg/ml; f = 1,4 mg/ml; g = 1,6 mg/ml Ristocetin)

Bei der zahlenmäßigen Erfassung der Aggregation mit Hilfe des Zellzählgerätes zeigte sich ab einer Ristocetin-Konzentration von o,9 mg/ml eine ausgeprägte Aggregationsreaktion, die durch eine Erhöhung der Testdosis nur mäßig gesteigert werden konnte. Bei einer Konzentration der Testsubstanz von o,8 mg/ml oder weniger ist die Aggregationsreaktion unzuverlässig. Die Schwankungsbreite der Bestimmung ist hier sehr groß. Die Ergebnisse der Untersuchungen bei 7 gesunden Probanden sind in Abb.7 zusammengefaßt.

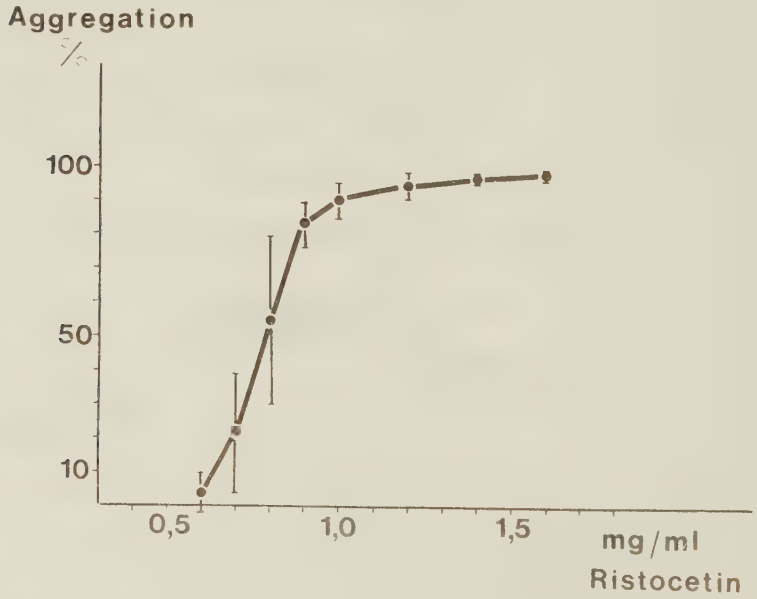


Abb.7: Konzentrationsabhängigkeit der Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation bei 7 gesunden Probanden.
(Ergebnisse ausgedrückt in % Aggregation jeweils Mittelwert $\bar{x} \pm 1\ s_{n-1}$)

Innerhalb des Patientenkollektivs zeigte die Bestimmung der Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation bei der niedrigen Testdosis von 1,o mg/ml Ristocetin bei insgesamt 54 einzelnen Untersuchungen in 44 Fällen ($\hat{=}$ 81%) ein pathologisches Ergebnis. Bei der höheren Testdosis von 1,2 mg/ml Ristocetin war bei insgesamt 66 einzelnen Untersuchungen in 48 Fällen ($\hat{=}$ 73%) ein pathologischer Befund zu erheben.
Bei einem pathologischen Ausfall mit den verwendeten Routinedosen wurden bei einigen Patienten weitere Untersuchungen mit 1,4 bzw. 1,6 mg/ml Ristocetin durchgeführt. Hier konnte bei einem Teil der Patienten eine Normalisierung der Reaktion ausgelöst werden. Zum Teil war aber auch bei hohen Testdosen keine befriedigende Aggregationsreaktion erkennbar.

Beispielhaft seien die Aggregationskurven zweier Patienten wiedergegeben.

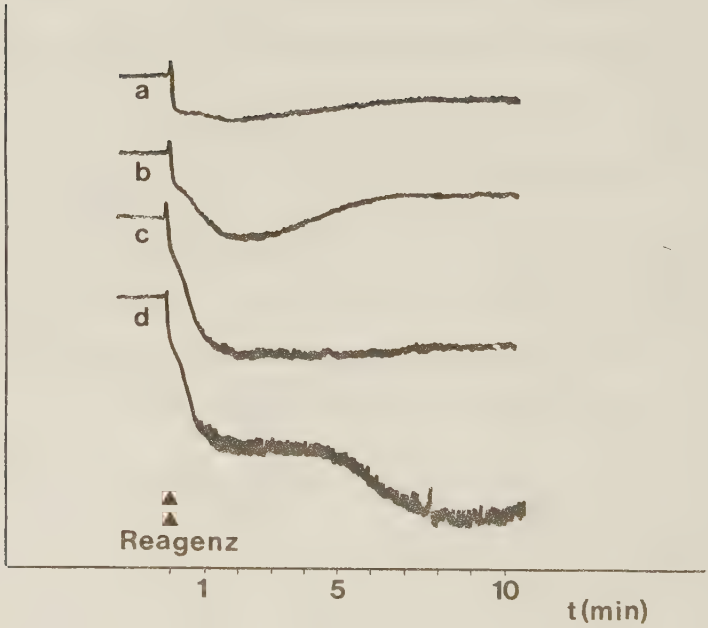


Abb.8: Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation bei Patient Nr. 41.

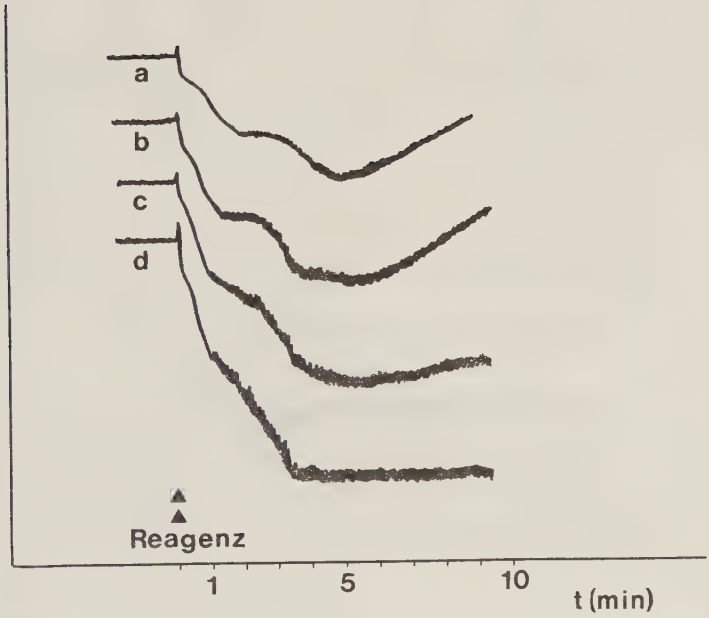


Abb.9: *Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation bei Patient Nr. 42.*
(verwendete Testdosen jeweils:
a = 1,o mg/ml; b = 1,2 mg/ml;
c = 1,4 mg/ml; d = 1,6 mg/ml Ristocetin)

3.2. Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation

3.2.1 Aggregationsreaktion

Die erste Reaktion der Thrombozyten auf die Zugabe von Arachidonsäure besteht in einem ausgeprägten Formwandel, erkennbar an einer Abnahme der Transmission. Der Formwandel beginnt unmittelbar nach der Zugabe der Testsubstanz, wobei der Zeitpunkt der Reagenzzugabe als Peak ebenfalls gut erkennbar ist. Eine Latenzzeit, wie sie bei der Kollagen-induzierten Aggregation auftritt, ist nicht ausgeprägt. Aus dem Formwandel heraus beginnt die Aggregationsreaktion, die stets monophasisch ist und rasch ihren Endpunkt erreicht. Eine wesentliche sekundäre Desaggregation tritt nicht auf.

Das Gesamtbild der Aggregationsreaktion ähnelt am ehesten der Kollagen-induzierten Aggregation, wegen der fehlenden Latenzzeit läuft die Arachidonsäure-induzierte Reaktion aber rascher ab.

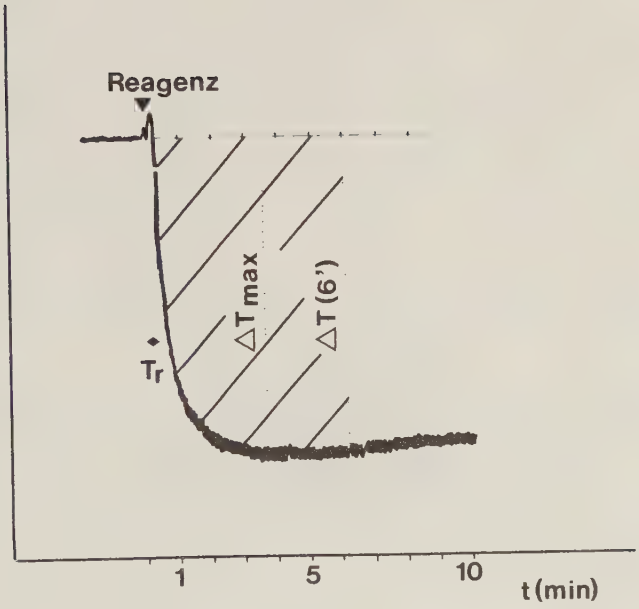


Abb.1o: *Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation.*
(Abkürzungen entsprechen denen in Abb.4)

3.2.2 Konzentrationsabhängigkeit der Reaktion

In niedriger Konzentration (1,2 - 2,4 x 10^{-4} mol Endkonzentration) erzeugt Arachidonsäure lediglich einen Formwandel der Thrombozyten ohne nachfolgende Aggregation. Typischerweise ist dieser Formwandel nicht reversibel, sondern bleibt über die Beobachtungszeit stabil.

Bei einer Erhöhung der Konzentration der Testsubstanz wird plötzlich eine Aggregationsreaktion ausgelöst. Die dafür erforderliche Dosis ist individuell verschieden und schwankt zwischen 2,4 und 4,8 x 10^{-4} mol. Mit einer Endkonzentration von 4,8 x 10^{-4} mol konnte bei allen Probanden eine typische Aggregation ausgelöst werden.

Eine darüber hinausgehende Steigerung der verwendeten Testdosis verstärkt die Aggregationsreaktion nur noch leicht. Lediglich die Reaktionszeit T_r wird weiter verkürzt.

Die Abb.11 gibt die Konzentrationsabhängigkeit der Reaktion in einem typischen Beispiel wieder.

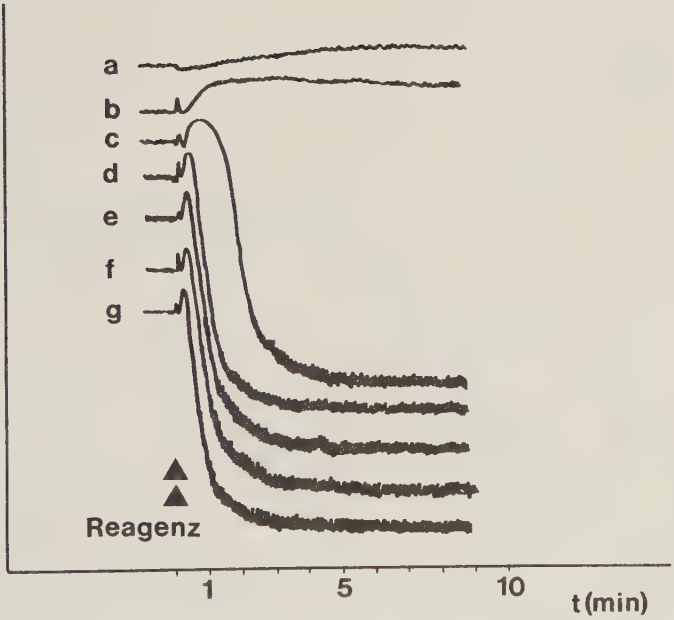


Abb.11: Konzentrationsabhängigkeit der Arachidonsäure-induzierten Aggregation in einem typischen Beispiel.
(a = 1,2, b = 2,4, c = 3,6, d = 4,8, e = 6,o, f = 9,o x $1o^{-4}$ mol; g = 1,2 x $1o^{-3}$ mol Arachidonsäure)

In den Abb. 12 und 13 sind die Ergebnisse von 7 gesunden Probanden zusammengefaßt.

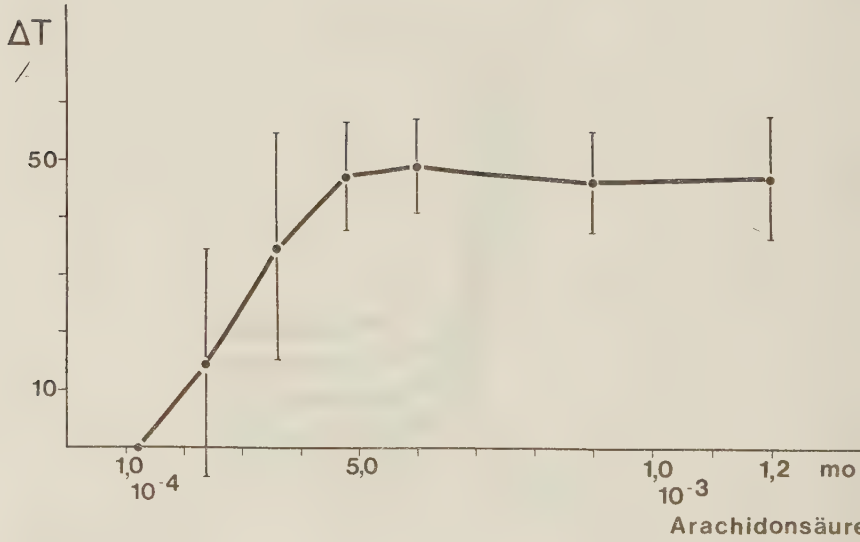


Abb.12: Arachidonsäure-induzierte Aggregation: Konzentrationsabhängigkeit von ΔT (6') bei 7 gesunden Probanden. (jeweils Mittelwert $\bar{x} \pm 1\ s_{x-1}$)

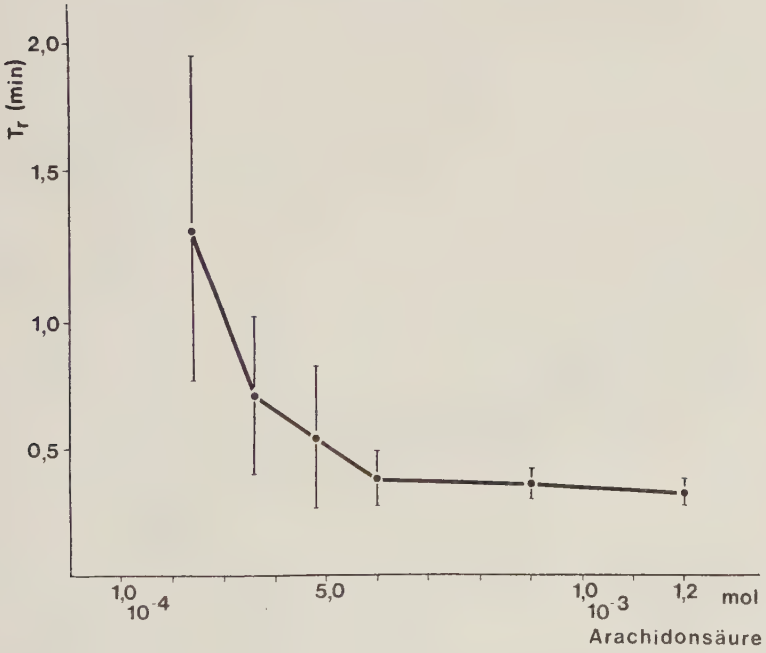


Abb.13: Arachidonsäure-induzierte Aggregation: Konzentrationsabhängigkeit der Reaktionszeit T_r bei 7 gesunden Probanden. (jeweils Mittelwert $\bar{x} \pm 1\ s_{n-1}$)

3.2.3 Abhängigkeit der Reaktion vom Zeitpunkt der Blutentnahme

Bei 7 gesunden Probanden wurde gleichzeitig die Abhängigkeit der Aggregationsreaktion vom Zeitpunkt der Blutentnahme untersucht.
Die Ergebnisse sind in den Abb. 14 und 15 zusammengestellt.

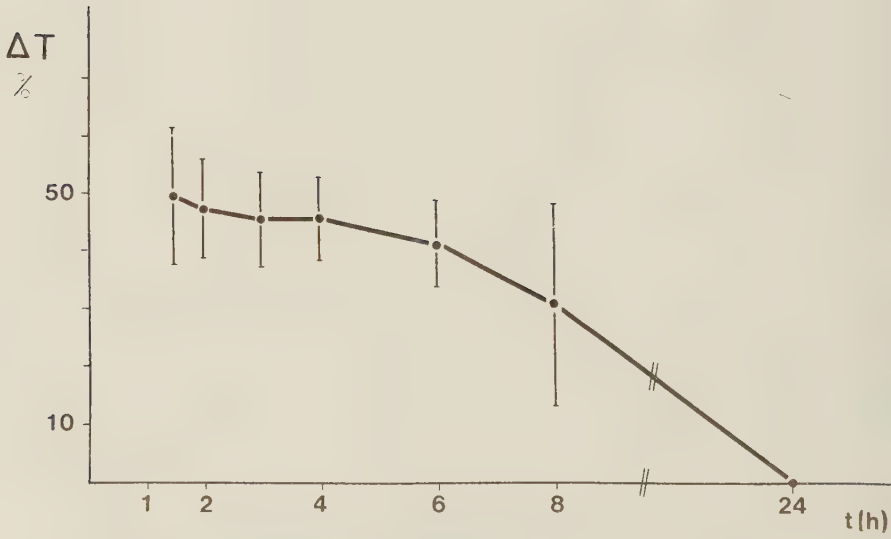


Abb.14: Arachidonsäure-induzierte Aggregation: Abhängigkeit von ΔT (6') vom Zeitpunkt der Blutentnahme bei 7 gesunden Probanden. (jeweils Mittelwert $\bar{x} \pm 1\ s_{n-1}$)

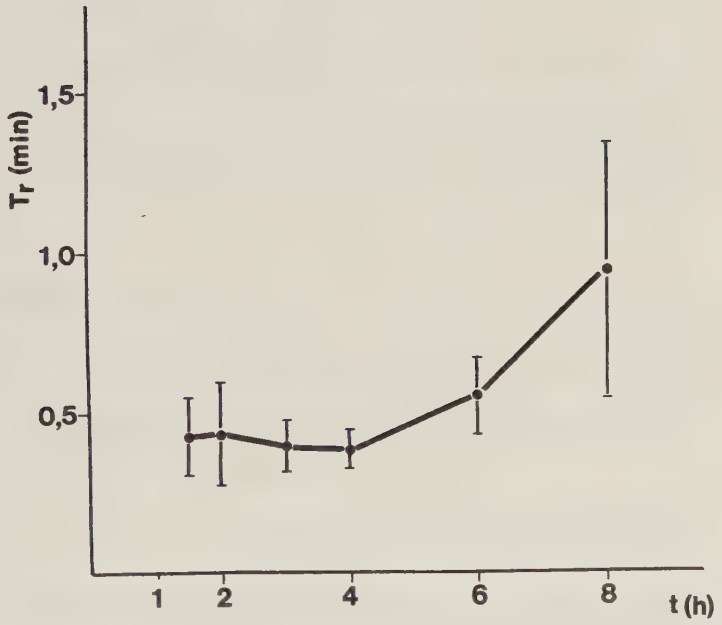


Abb.15: Arachidonsäure-induzierte Aggregation: Abhängigkeit der Reaktionszeit T_r vom Zeitpunkt der Blutentnahme bei 7 gesunden Probanden. (jeweils Mittelwert $\bar{x} \pm 1\ s_{n-1}$)

Der früheste Untersuchungszeitpunkt lag 9o Minuten nach erfolgter Blutentnahme.
Bis 4 Stunden nach der Blutentnahme bleibt die Aggregationsreaktion weitgehend stabl. Danach kommt es zu einer zunehmenden Abschwächung der Reaktion bei gleichzeitig zunehmender Reaktionszeit T_r.
8 Stunden nach der Blutentnahme findet sich bereits vereinzelt ein Ausfall der Aggregationsreaktion bei erhaltenem Formwandel.
Nach 24 Stunden ist in allen Fällen nur noch ein Formwandel auslösbar, eine Aggregation tritt nicht mehr auf.
Als günstigster Untersuchungstermin bietet sich also die Zeit 9o Minuten bis 4 Stunden nach der Blutentnahme an. Diese Zeitspanne wurde auch bei der Untersuchung der Patientenproben strikt eingehalten.

3.2.3 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Meßwerte wurde zunächst bei einem Probanden eine Meßserie von 1o Einzelmessungen aus einem Versuchsansatz in unmittelbarer Folge durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Tab. 2 zusammengefaßt.

	$\bar{x}$	s_{n-1}	v_k
ΔT (6')	38,6%	2,7%	7,o%
Fläche (6')	38,5 cm^2	2,35 cm^2	6,1%
T_r	o,35 - o,45 '		

Tab.2: Arachidonsäure-induzierte Aggregation: Meßwerte von 1o Einzelmessungen bei einem Probanden in Folge. ($1o^{-4}$ mol Endkonzentration)

Die Variationskoeffizienten des Transmissionsunterschiedes ΔT (6') sowie der Fläche (6') lagen hierbei mit Werten zwischen 5% und 7% in einem für Thrombozytenaggregationstests üblichen Bereich. Auch die Reaktionszeit T_r blieb stabil.

Weiterhin wurde bei insgesamt 3o gesunden Probanden (16 Frauen und 14 Männern) eine Routinemessung an verschiedenen Untersuchungstagen durchgeführt. Die Meßwerte sind in der Tab.3 zusammengefaßt.

	$\bar{x}$	s_{n-1}	v_k
ΔT (6')	45,9%	6,9%	15,0%
Fläche (6')	47,3 cm^2	7,9 cm^2	16,7%
T_r	0,25 - 0,80 '		
% Desaggregation	5%		

Tab.3: Arachidonsäure-induzierte Aggregation: Meßwerte von 30 gesunden Probanden. (Testdosis = 6 x 10^{-4} mol Endkonzentration)

Auch hier lagen die Variationskoeffizienten des Transmissionsunterschiedes ΔT (6') und der Fläche (6') mit Werten zwischen 15% und 17% in einem für Thrombozytenaggregationstests üblichen Bereich. Die Reaktionszeit T_r bewegte sich in einem Bereich zwischen 0,25 und 0,8 Minuten, die sekundäre Desaggregation blieb gering.

3.2.4 Unspezifisch pathologische Reaktionen

Bei den Voruntersuchungen an gesunden Probanden, die sicher keine Analgetika oder andere, die Thrombozytenaggregation hemmende Medikamente eingenommen hatten, konnte in einigen Fällen im Routineansatz mit Arachidonsäure keine Aggregation ausgelöst werden. Bei der weiteren Abklärung zeigte sich regelmäßig eine gute Aggregationsreaktion im unverdünnten plättchenreichen Plasma. In den verdünnten Plasmaproben fiel die Reaktion dann im Routineansatz (z.B. PRP 1:4 verdünnt mit eigenem PAP) negativ aus. Die Aggregationsreaktionen nach Kollagen- oder Ristocetinreiz waren dagegen nicht beeinträchtigt.
Ein typisches Beispiel ist in Abb.16 wiedergegeben.

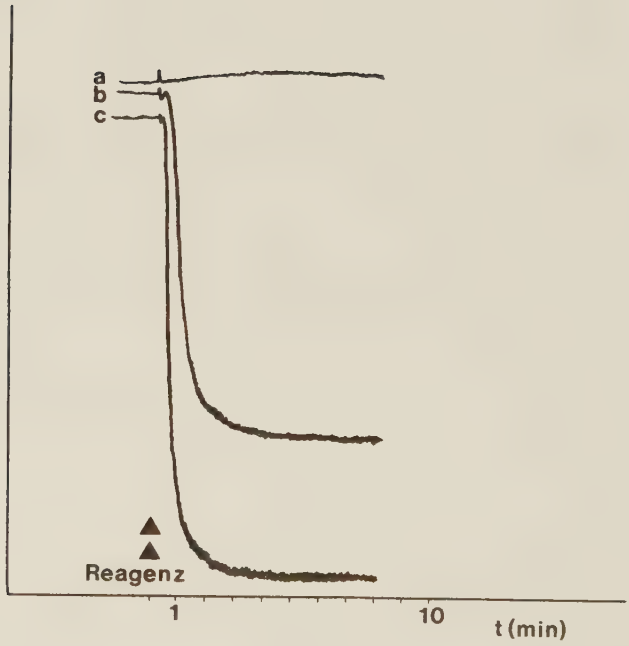


Abb.16: *Arachidonsäure-induzierte Aggregation: unspezifisch pathologische Reaktion in der verdünnten Plasmaprobe.*
(a = PRP 1:4 verdünnt mit PAP,
b = PRP 1:2 verdünnt mit PAP,
c = PRP unverdünnt, Gerät lediglich zwischen 0% und 4o% geeicht,
Testdosis = 6 x 1o^{-4} mol Endkonzentration)

Der Effekt war in allen Fällen nicht sicher reproduzierbar. Bei weiteren Untersuchungsterminen zeigte sich bei demselben Probanden eine ungestörte Aggregationsreaktion.

Da es sich bei diesem Effekt am ehesten um eine sekundäre Hemmung der Aggregation durch (aus Thrombozyten?) freigesetzte Substanzen handelt, haben wir die Zentrifugationsbedingungen zur Herstellung des plättchenarmen Plasmas verändert.

1) Zentrifugation bei 2.5oo x g und + 4°C
2) Zentrifugation bei 2.5oo x g und + 37°C
3) Zentrifugation bei 1o.ooo x g und + 4°C
4) Zentrifugation bei 1o.ooo x g und + 37°C

Testdurchführung mit PRP 1:4 mit eigenem PAP verdünnt.

Auch diese Maßnahmen führten nicht regelmäßig zu einem pathologischen Ausfall der Aggregation.

Wir haben daher in den Fällen, in denen sich im Routineansatz eine isolierte Störung der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation bei normalem Ausfall

der Kollagen- und/oder Ristocetin-induzierten Aggregation zeigte, die Arachidonsäure-induzierte Aggregation im unverdünnten PRP kontrolliert. War die Reaktion dann nicht beeinträchtigt, haben wir den Befund als nicht pathologisch gewertet.

3.2.5 Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation bei Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung

Die Bestimmung der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation war bei insgesamt 33 Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung möglich.
Die Ergebnisse sind in der Tab.4 zusammengefaßt. Zusätzlich sind die Resultate der Ristocetin- und der Kollagen-induzierten Aggregation aufgeführt.

lfd.Nr.	Ristocetin 1,o mg/ml	1,2 mg/ml	Kollagen 1,o µg/ml	2,o µg/ml	Arachidonsäure 6 x $1o^{-4}$ mol	
1	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
2	path.	path.	path.	path.	o.B.	(Analgetikaeinnahme vor 3 Tagen)
3	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
11	path.	path.			o.B.	
13	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
14	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
15	path.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	
16	path.	path.	path.	path.	neg.	(Analgetikaeinnahme nicht bekannt)
17	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
18	path.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	
2o	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
22	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
23	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
24	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	
25	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	
26	path.	o.B.	sh.ch.	o.B.	o.B.	
28	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
31	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
32	path.	path.	o.B.	o.B.	sek.Desaggr.	(Kontrolle im unverd. PRP o.B.)
	path.	path.	o.B.	o.B.		

lfd.Nr.	Ristocetin 1,o mg/ml	1,2 mg/ml	Kollagen 1,o µg/ml	2,o µg/ml	Arachidonsäure 6 x $1o^{-4}$ mol	
33	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
	path.	path.	o.B.	o.B.	sek.Desaggr.	(Kontrolle im unverd. PRP o.B.)
36	path.	path.	sh.ch.	path.	sh.ch.	(Analgetikaeinnahme nicht bekannt)
	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
38	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	
39	path.	o.B.	path.	o.B.	sh.ch.	(Analgetikaeinnahme nicht bekannt)
4o	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	
41	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
42	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
43	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
45	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
46	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
49	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
5o	path.	path.	path.	path.	sh.ch.	(Analgetikaeinnahme nicht bekannt)
51	path.	path.	o.B.	o.B.	o.B.	
52	path.	o.B.	o.B.	o.B.	o.B.	

Tab.4: Ergebnisse der Thrombocytenaggregations-Studien bei 33 Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung
(neg. = negative Reaktion, d.h. völliger Ausfall des Formwandels und der Aggregationsreaktion.
sh.ch. = isolierter Formwandel ohne nachfolgende Aggregationsreaktion.
path. = Abschwächung der Aggregationsreaktion (und ggf. des Formwandels).
sek.Desaggr. = Aggregationsreaktion mit nachfolgender sekundärer Desaggregation.)

Insgesamt fand sich bei 27 der 33 untersuchten Patienten ein normaler Ausfall der Arachidonsäure-induzierten Aggregation. Unter diesen Patienten fiel die Kollagen-induzierte Aggregation in einem Fall (Pat. Nr. 2) deutlich pathologisch aus. Es handelt sich hierbei um einen Restzustand nach vorangegangener Analgetikaeinnahme. In einem weiteren Fall (Pat. Nr. 26) war bei der niedrigen Testdosis von 1,o µg/ml Kollagen lediglich ein Formwandel auslösbar.

Die Bestimmung der Arachidonsäure-induzierten Aggregation ergab bei zwei weiteren Patienten im verdünnten PRP nach einer primären Aggregation eine ausgeprägte sekundäre Desaggregation. Diese Veränderungen waren bei der Kontrolle im unverdünnten PRP nicht mehr nachweisbar. Bei beiden Patienten konnte an einem zweiten Untersuchungstermin die Arachidonsäure-induzierte Aggregation erneut kontrolliert werden. Es zeigte sich dann eine völlig normale Aggregationsreaktion auch im verdünnten PRP.

Bei den vier verbleibenden Patienten fand sich ein deutlich pathologischer Ausfall der Arachidonsäure-induzierten Aggregation. In drei Fällen war lediglich ein Formwandel ohne Aggregationsreaktion auslösbar,

im vierten Fall war die Reaktion völlig negativ. Bei allen vier Patienten war auch ein vergleichbarer pathologischer Ausfall der Kollagen-induzierten Aggregation erkennbar. Eine Analgetikaeinnahme wurde von allen Patienten verneint.
Bei einem dieser Patienten (Pat. Nr. 36) war eine erneute Kontrolle nach einigen Wochen möglich. Hierbei waren die pathologischen Befunde sowohl der Arachidonsäure- als auch der Kollagen-induzierten Aggregation nicht mehr nachweisbar. Die anderen drei Patienten konnten bisher nicht erneut kontrolliert werden.

3.2.6 Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation bei nicht erkrankten Familienangehörigen der Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung

Weiterhin konnte die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation im Rahmen von Familienuntersuchungen bei insgesamt 15 nicht erkrankten Familienangehörigen der Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung getestet werden. Die resultierenden Ergebnisse sind hier nicht im einzelnen aufgelistet.
Hierbei war ein pathologischer Befund in keinem Fall zu erkennen.

Die Ristocetin- und die Kollagen-induzierte Aggregation war ebenfalls unauffällig, lediglich in einem Fall zeigte sich bei der Kollagen-induzierten Aggregation mit der niedrigen Testdosis von 1,o µg/ml ein isolierter Formwandel ohne Aggregationsreaktion.

3.2.7 Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation bei Patienten mit hereditärer Thrombasthenie

Bei einem kleinen Patientenkollektiv von 3 Patienten, die an einer hereditären Thrombasthenie Glanzmann litten, wurde neben den Routinetests zur Beurteilung der Thrombozytenfunktion auch die Arachidonsäure-induzierte Aggregation geprüft.
Die Patienten zeigten einheitlich eine Verlängerung der Blutungszeit und einen pathologischen Ausfall der Thrombozytenretention. Bei den Thrombozytenaggregationsstudien zeigte sich nach Kollagen- und Arachidonsäurereiz ein isolierter Formwandel, der über die gesamte Beobachtungszeit stabil blieb. Eine Aggregationsreaktion konnte auch mit höheren Testdosen (4 µg/ml Kollagen und $1,2 \times 1o^{-3}$ mol Arachidonsäure) nicht ausgelöst werden. Nach Zugabe von Ristocetin fand sich bei allen verwendeten Testdosen (1,o; 1,2; 1,4 und 1,6 mg/ml) lediglich eine primäre Aggregationswelle mit ausgeprägter

sekundärer Desaggregation. Eine sekundäre Aggregationswelle konnte in keinem Fall ausgelöst werden.

Ein typisches Beispiel ist in Abb.17 dargestellt.

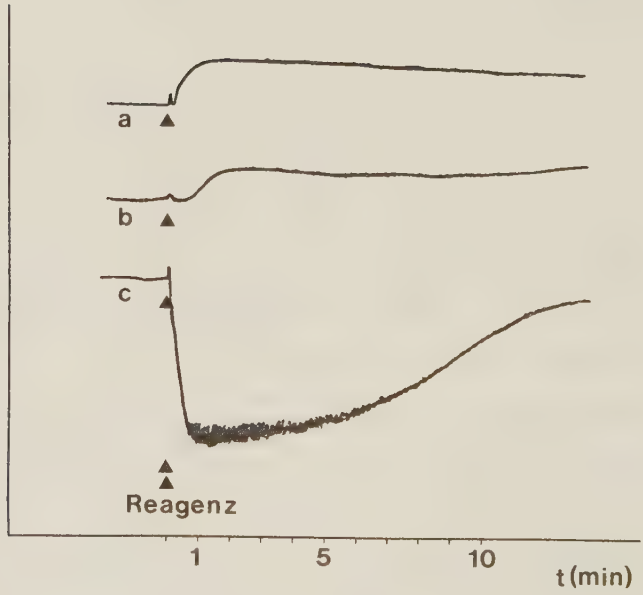


Abb.17: Thrombozytenaggregationstests bei einem Patienten mit hereditärer Thrombasthenie.
(a = Arachidonsäure, 6 x $1o^{-4}$ mol,
b = Kollagen, 2 µg/ml,
c = Ristocetin, 1,2 mg/ml)

Parallel durchgeführte Untersuchungen bei 4 Familienangehörigen der obigen Patienten, die nicht an einer Blutungsneigung litten, ergaben einen völlig normalen Ausfall der Thrombozytenretention und der Thrombozytenaggregation nach Kollagen-, Arachidonsäure- und Ristocetinreiz. Auch die Blutungszeit war normal. Bei zwei dieser Familienangehörigen handelt es sich um Elternteile der erkrankten Patienten. Hier ist aufgrund des Erbgangs mit Sicherheit eine heterozygote Anlage der Erkrankung anzunehmen.

3.2.8 Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation nach Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern

Bei insgesamt 15 Patienten konnte die Wirkung von Thrombozytenaggregationshemmern auf die Arachidonsäure-induzierte Aggregation überprüft werden.
Die Patienten hatten entweder Acetylsalicylsäure zur Thromboseprophylaxe oder acetylsalicylsäurehaltige analgetische Mischpräparate eingenommen.
Die Ergebnisse sind in der Tab.5 zusammengefaßt.

	Arachidonsäure 6×10^{-4} mol	Kollagen 1 µg/ml	2 µg/ml	Ristocetin 1,0 mg/ml	1,2 mg/ml	Medikament
Nr. 1	neg.					ASS 3x500 mg/die
Nr. 2	neg.	path.	path.	pr.Aggr.	pr.Aggr.	ASS 3x500 mg/die
Nr. 3	neg.	path.	path.	pr.Aggr.	pr.Aggr.	ASS 3x500 mg/die
Nr. 4	neg.	path.	path.	pr.Aggr.	o.B.	Thomapyrin 1 Tabl.
Nr. 5	neg.	path.	path.	pr.Aggr.	pr.Aggr.	MAS 1 Tabl.
Nr. 6	neg.		path.	pr.Aggr.	pr.Aggr.	Dolomo 1 Tabl.
Nr. 7	neg.	path.	path.	pr.Aggr.	pr.Aggr.	Thomapyrin 1 Tabl.
Nr. 8	sh.ch.	neg.	sh.ch.	pr.Aggr.	o.B.	Thomapyrin 1 Tabl.
Nr. 9	neg.	path.	path.	pr.Aggr.	pr.Aggr.	Thomapyrin 1 Tabl.
Nr. 10	neg.	path.	path.	pr.Aggr.	pr.Aggr.	Gelonida 1 Tabl.
Nr. 11	neg.	path.	path.	o.B.	o.B.	ASS 3x500 mg/die
Nr. 12	neg.	path.	path.	pr.Aggr.	pr.Aggr.	ASS 3x500 mg/die
Nr. 13	neg.	neg.	neg.	pr.Aggr.	pr.Aggr.	ASS 1.000 mg
Nr. 14	neg.	path.	path.	pr.Aggr.	pr.Aggr.	ASS 5x500 mg/die
Nr. 15	neg.	path.	path.	pr.Aggr.	o.B.	Thomapyrin 1 Tabl.

Tab.5: Ergebnisse der Thrombozytenaggregations-Studien bei 15 Patienten, die die Thrombozytenaggregation hemmende Medikamente eingenommen hatten.
(neg. = negative Reaktion, d.h. völliger Ausfall des Formwandels und der Aggregationsreaktion.
sh.ch. = isolierter Formwandel ohne nachfolgende Aggregationsreaktion.
path. = Abschwächung des Formwandels und der Aggregationsreaktion.
pr.Aggr. = Ausfall der sekundären Aggregation bei Erhalt der primären Aggregationswelle.
ASS = Actylsalicylsäure.)

Bei 14 der 15 untersuchten Patienten fand sich nach Arachidonsäurereiz ein vollständiger Ausfall des Formwandels und der Aggregationsreaktion. In einem Fall (Pat. Nr. 8) konnte ein isolierter Formwandel ohne nachfolgende Aggregation ausgelöst werden.
Nach Kollagenreiz zeigte sich bei allen Patienten eine deutlich pathologische Reaktion mit Abschwächung des Formwandels und der Aggregationsreaktion. Bei Patient Nr. 8 war mit der höheren Testdosis von 2 µg/ml Kollagen ein isolierter Formwandel auslösbar.
Nach Ristocetinreiz fand sich in 1o Fällen bei beiden verwendeten Testdosen (1,o bzw. 1,2 mg/ml) lediglich eine primäre Aggregation mit Verlust der sekundären Aggregationswelle.
In 3 Fällen zeigte sich bei der höheren Testdosis von 1,2 mg/ml eine normale Aggregationsreaktion bei typisch pathologischem Ausfall bei der niedrigeren Testdosis von 1,o mg/ml.
Bei Patient Nr. 11 war die Reaktion bei beiden Testdosen nicht beeinträchtigt.

3.3. Zweidimensionale Immunelektrophorese des Faktor-VIII-Moleküls

3.3.1 Normales Erscheinungsbild der Proteine

Bei der zweidimensionalen Immunelektrophorese erscheint das Faktor-VIII-Molekül in einem nahe der Auftragsstelle gelegenen, breitbasigen Präzipitat. Bemerkenswert ist die Asymmetrie des Präzipitats mit einer relativen Vermehrung der kathodennahen Anteile und einer ausgeprägten Schiefe anodenwärts.
Das Präzipitat des alpha-1-Antitrypsins findet sich deutlich anodenwärts von dem des Faktor-VIII-Moleküls als steil aufsteigender, ebenfalls breitbasiger Peak. Auf der Höhe des Hauptpräzipitats findet sich ein zweiter, flach ausgeprägter Peak, der ebenfalls dem alpha-1-Antitrypsin zuzuordnen ist.
Zusätzlich verläuft eine dritte Präzipitatlinie kontinuierlich aus dem Hauptpeak heraus kathodenwärts bis auf die Höhe des Faktor-VIII-Präzipitats. Hier ist das Protein nicht oder nur wenig aus dem Primärgel heraus in das Sekundärgel gewandert.
In den Abb. 18 und 19 ist das oben beschriebene Erscheinungsbild in typischen Beispielen wiedergegeben.

Abb.18: Zweidimensionale Immunelektrophorese von Normalplasma - Darstellung des alpha-1-Antitrypsins. (Primärphase: Kathode links, Anode rechts, Sekundärphase: Kathode unten, Anode oben, Anti-alpha-1-Antitrypsin-Serum 3,5% v/v)

Abb.19: Zweidimensionale Immunelektrophorese von Normalplasma - Darstellung des Faktor-VIII-Moleküls und des alpha-1-Antitrypsins. (Primärphase: Kathode links, Anode rechts, Sekundärphase: Kathode unten, Anode oben, Anti-Faktor-VIII-AP-Serum o,8% v/v, Anti-alpha-1-Antitrypsin-Serum 3,5% v/v)

Zur zahlenmäßigen Erfassung des Wanderungsverhaltens wurde zunächst die Spitze des Faktor-VIII-Präzipitats markiert und die Wanderungsstrecke vom Auftragungsort her gemessen.
Bei dem Präzipitat des alpha-1-Antitrypsins wurde der Mittelpunkt zwischen den Präzipitataußenlinien verwendet und ebenfalls die Wanderungsstrecke vom Auftragungsort her gemessen.
Als relative elektrophoretische Mobilität (REM) des Faktor-VIII-Moleküls wurde dann das Verhältnis der Wanderungsstrecke des Faktor-VIII-Moleküls zur Wanderungsstrecke des alpha-1-Antitrypsins errechnet.

$$REM\ (Faktor\text{-}VIII\text{-}AP) = \frac{F\text{-}VIII\text{-}Wanderungsstrecke}{alpha\text{-}1\text{-}Antitrypsin\text{-}Wanderungsstrecke}$$

3.3.2 Wanderungsverhalten des Faktor-VIII-Moleküls bei gesunden Probanden

Zur Ermittlung von Normalwerten für das Wanderungsverhalten des Faktor-VIII-Moleküls wurden Plasmaproben von insgesamt 15 gesunden Probanden untersucht.
Die ermittelten Ergebnisse sind nachstehend zusammengefaßt.

REM (F-VIII-AP): $\bar{x} \pm 2\, s_{n-1} = 0{,}34 - 0{,}44$

$v_k = 6{,}4\%$

Die REM-Werte bewegten sich also in einem engen Bereich zwischen 0,34 und 0,44. Der Variationskoeffizient ist mit 6,4% für immunologische Tests niedrig.

3.3.3 Konzentrationsabhängigkeit des Wanderungsverhaltens im elektrischen Feld

Zur Beurteilung der Konzentrationsabhängigkeit des Wanderungsverhaltens wurde eine Probe, die aus den Plasmen von 10 gesunden Probanden gemischt war, in einer geometrischen Reihe mit Humanalbumin verdünnt. Hierfür wurde Humanalbumin reinst für elektrophoretische Zwecke (Fa. Behring, Marburg) verwendet, das in Barbital-Na_2EDTA-Puffer entsprechend einer Endkonzentration von 4,5 g/dl aufgelöst war.
Die Ergebnisse sind in den Abb.20-22 zusammengestellt.

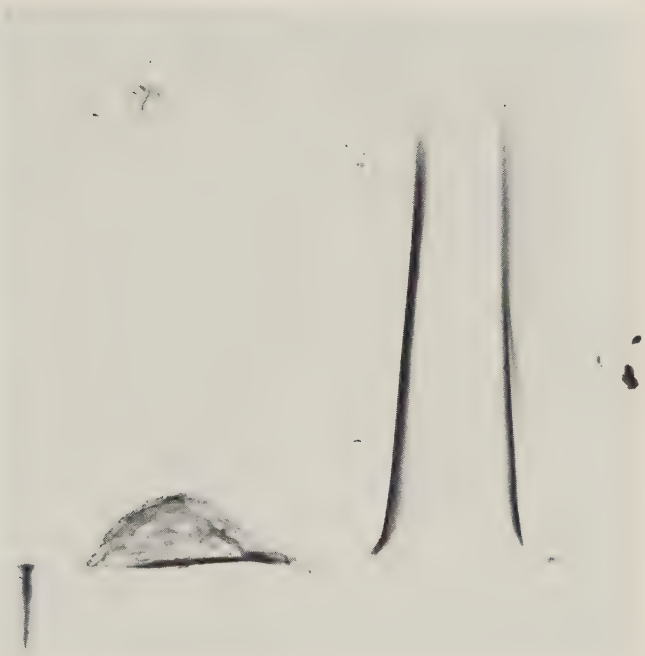


Abb.2o: Zweidimensionale Immunelektrophorese von Normalplasma, verdünnt in Humanalbumin reinst, Verdünnung 1:2.
(technische Daten wie in Abb.19)

Abb.21: Zweidimensionale Immunelektrophorese von Normalplasma, verdünnt in Humanalbumin reinst, Verdünnung 1:8.
(technische Daten wie in Abb.19)

Abb.22: Zweidimensionale Immunelektrophorese von Humanalbumin ohne Zusatz von Normalplasma. (technische Daten wie in Abb.19)

Mit abnehmender Konzentration des Faktor-VIII-Moleküls verkleinert sich erwartungsgemäß das zugehörige Präzipitat. Gleichzeitig bildet sich auch die Asymmetrie zunehmend zurück und ist in der 1:8-Verdünnung nicht mehr ausgeprägt. In der Auftrennung der reinen Humanalbumin-Lösung ist Faktor VIII nicht mehr nachweisbar.

Auch das Präzipitat des alpha-1-Antitrypsins verkleinert sich mit zunehmender Verdünnung der Probe. Es verbleibt in der 1:8-Verdünnung lediglich der steile Hauptpeak. In der Auftrennung der reinen Humanalbumin-Lösung sind kleine Restmengen an alpha-1-Antitrypsin als schwaches Präzipitat im Primärgel erkennbar (siehe Pfeil in Abb.22).

3.3.4 Wanderungsverhalten des Faktor-VIII-Moleküls bei Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung

Die immunelektrophoretische Auftrennung des Faktor-VIII-Moleküls war bei insgesamt 41 Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung möglich.
Hierbei konnte aufgrund des sehr niedrigen Gehaltes an Faktor-VIII-AP bei 14 Patienten ein Präzipitat des Faktor-VIII-Moleküls nicht dargestellt werden.

Wegen der Möglichkeit der Überlagerung eines flachen Faktor-VIII-Präzipitates durch das Präzipitat des alpha-1-Antitrypsins wurden diese Proben ohne Anti-alpha-1-Antitrypsin-Serum wiederholt. Hierbei konnte in drei Fällen ein niedriges, symmetrisch ausgebildetes Präzipitat des Faktor-VIII-Moleküls dargestellt werden. Das Wanderungsverhalten wich in allen Fällen nicht von der Norm ab. Bei den übrigen Patienten war auch mit dieser Maßnahme ein Faktor-VIII-Präzipitat nicht erkennbar.
Bei 27 der untersuchten Patienten war dagegen ein Präzipitat des Faktor-VIII-Moleküls dargestellt.
Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der Tab.6 zusammengestellt.

lfd.Nr.	REM-Wert	Testwiederholung ohne Anti-alpha-1-Antitrypsin-Serum
1)	no	no
2)	o,4o	
3)	no	
4)	o,4o	
5)	no	no
6)	o,43	
7)	o,36	
8)	o,42 o,45	
9)	o,43 no	 normal
1o)	o,59 o,38	
11)	o,42	
13)	no	no
14)	o,45	
15)	no	normal
16)	no	no
17)	no	no
18)	o,44	
19)	o,39	
2o)	o,46	
21)	o,45	
22)	no	no
23)	no	no
24)	o,33	
25)	o,37	
27)	o,34	
28)	o,41	

lfd.Nr.	REM-Wert	Testwiederholung ohne Anti-alpha-1-Antitrypsin-Serum
29)	o,42	
3o)	o,39	
31)	o,42	
32)	no	no
33)	no	no
35)	o,35	
37)	o,36	
38)	o,33	
39)	o,42	
4o)	o,39	
41)	no	normal
42)	no	normal
44)	no	no
45)	o,51	
46)	o,5o	

Norm: o,34 - o,44

Tab.6: Zweidimensionale Immunelektrophorese des Faktor-VIII-Moleküls bei 41 Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung.
(no - = kein Präzipitat erkennbar,
normal = Präzipitat an typischer Stelle nachweisbar,
pathologische REM-Werte unterstrichen)

Wie aus der Tabelle ersichtlich, lagen die REM-Werte von 18 Patienten in dem oben bestimmten Normalbereich zwischen o,34 und o,44. Zwei Patienten wiesen einen geringfügig verkürzten REM-Wert von o,33 auf.
Bei 7 Patienten lagen die REM-Werte oberhalb des Normbereiches. Hierbei handelt es sich bei einem Patienten (Pat. Nr. 14) um einen nur leicht pathologischen, isolierten Befund, der sich bei den restlichen Familienangehörigen nicht wiederfindet. Der Faktor-VIII-AP-Gehalt ist bei dem Patienten deutlich erniedrigt (F-VIII-AP = 28%), entsprechend ist das Präzipitat flach und symmetrisch ausgeprägt.
Bei den Patienten Nr. 2o und Nr. 21 sowie Nr. 45 und Nr. 46 liegt dagegen eine variante Form der von-Willebrand-Erkrankung vor mit hohem Faktor-VIII-AP-Gehalt. Entsprechend findet sich ein gut ausgeprägtes, typisch asymmetrisches Präzipitat des Faktor-VIII-Moleküls. Das pathologische Muster der von-Willebrand-Erkrankung und das Wanderungsverhalten des Faktor-VIII-Moleküls ist bei diesen Patienten auch innerhalb der Kleinfamilien völlig konstant.
Die Befunde sind in den Abb.23-26 dokumentiert.

Abb.23: Zweidimensionale Immunelektrophorese des Faktor-VIII-Moleküls - Patient Nr. 2o. (technische Daten wie in Abb.19)

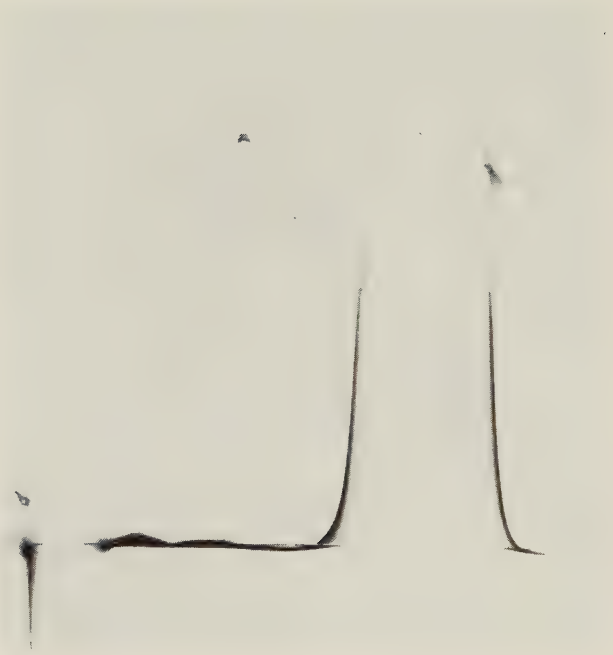


Abb.24: Zweidimensionale Immunelektrophorese des Faktor-VIII-Moleküls - Patient Nr. 21. (technische Daten wie in Abb.19)

Abb.25: Zweidimensionale Immunelektrophorese des Faktor-VIII-Moleküls - Patient Nr. 45. (technische Daten wie in Abb.19)

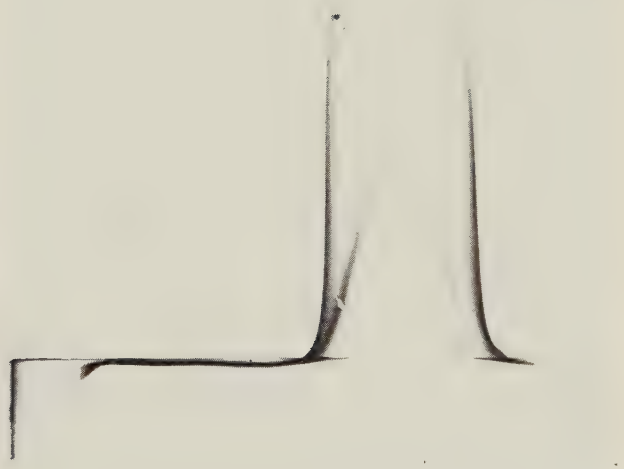


Abb.26: Zweidimensionale Immunelektrophorese des Faktor-VIII-Moleküls - Patient Nr. 46. (technische Daten wie in Abb.19)

Zusätzlich wurde Plasma der Patienten Nr. 45 und Nr. 46 zu gleichen Teilen mit Normalplasma gemischt und dann die Bestimmung ohne Anti-alpha-1-Antitrypsin-Serum wiederholt.

In beiden Fällen stellte sich ein zweigipfeliges Präzipitat dar, wobei der kathodennahe Peak dem Normalplasma zuzuordnen ist, während der anodenwärts gelegene Peak dem pathologischen Patientenplasma entspricht.

Die Befunde sind in den Abb.27 und 28 dokumentiert.

Abb.27: Zweidimensionale Immunelektrophorese des Faktor-VIII-Moleküls - Patient Nr. 45. (Patientenplasma 1:2 mit Normalplasma gemischt, keine Darstellung des alpha-1-Antitrypsins)

Ab.28: Zweidimensionale Immunelektrophorese des Faktor-VIII-Moleküls - Patient Nr. 46. (Patientenplasma 1:2 mit Normalplasma gemischt, keine Darstellung des alpha-1-Antitrypsins)

Bei der Patientin Nr. 1o fand sich aus einer Probe des ersten Untersuchungstermins ein deutlich pathologisches Wanderungsverhalten des Faktor-VIII-Moleküls mit einem REM-Wert von o,59.
Der Befund ist in Abb.29 dokumentiert.

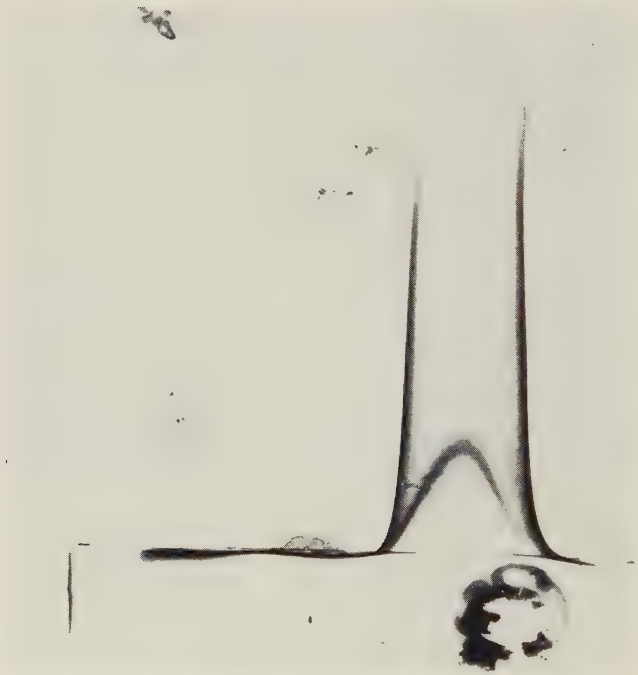


Abb.29: Zweidimensionale Immunelektrophorese des Faktor-VIII-Moleküls bei Pat. Nr. 1o (erster Untersuchungstermin). (technische Daten wie in Abb.19)

Gut getrennt von dem Präzipitat des alpha-1-Antitrypsins findet sich hier an atypischer Stelle ein niedriges Faktor-VIII-Präzipitat.
Aus einer Plasmaprobe eines zweiten Untersuchungstermins derselben Patientin war überraschenderweise dieses pathologische Wanderungsverhalten des Faktor-VIII-Moleküls nicht nachweisbar.
Wie aus Abb.3o ersichtlich, stellt sich an typischer Stelle ein gut ausgeprägtes, breitbasiges Faktor-VIII-Präzipitat dar.

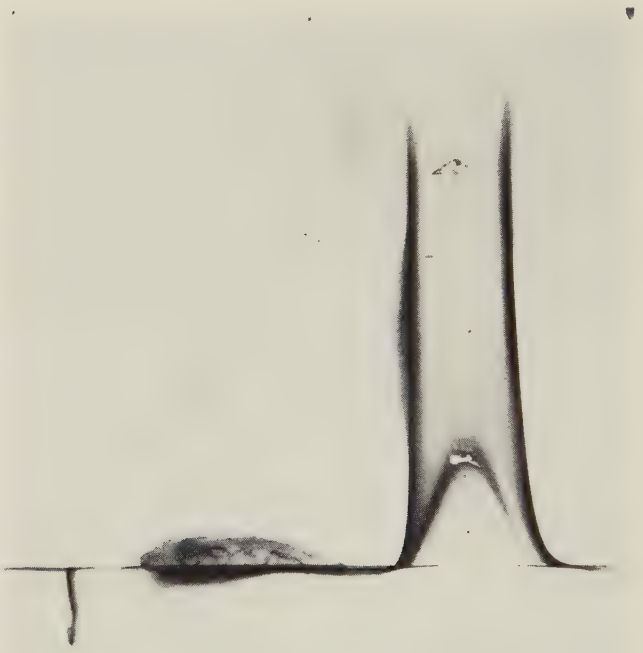
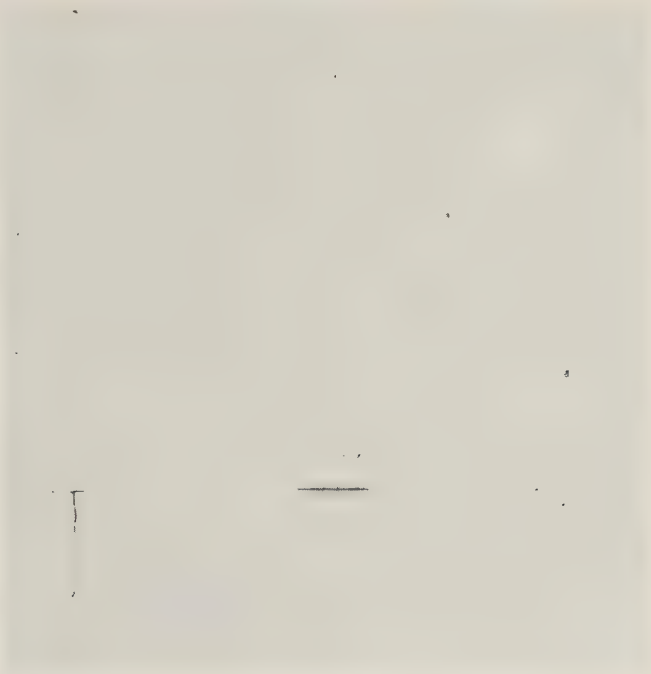


Abb.3o: Zweidimensionale Immunelektrophorese des Faktor-VIII-Moleküls bei Pat. Nr. 1o (zweiter Untersuchungstermin). (technische Daten wie in Abb.19)

Auch aus einem zweiten Versuchsansatz ohne Anti-alpha-1-Antitrypsin-Serum sind die Befunde gut ersichtlich.



Ab.31: Zweidimensionale Immunelektrophorese des Faktor-VIII-Moleküls bei Pat. Nr. 1o
- Probe der ersten Untersuchung -
(keine Darstellung des alpha-1-Antitrypsins)

Abb.32: Zweidimensionale Immunelektrophorese des Faktor-VIII-Moleküls bei Pat. Nr. 1o - Probe der zweiten Untersuchung - (keine Darstellung des alpha-1-Antitrypsins)

Vergleicht man die Präzipitate des Faktor-VIII-Moleküls aus beiden Untersuchungen miteinander, so fällt auf, daß bei der Probe der ersten Untersuchung lediglich ein anodennaher Anteil des Präzipitats verblieben ist. Der breitbasige kathodennahe Anteil ist dagegen nicht dargestellt.

Bei der Mutter und dem Bruder der Patientin liegt ebenfalls eine von-Willebrand-Erkrankung vor (Pat. Nr. 8 und 9). Beide Patienten konnten ebenfalls zu zwei verschiedenen Terminen untersucht werden. Hierbei ergab sich bei der Mutter (Pat. Nr. 8) bei der ersten Untersuchung ein normales Wanderungsverhalten des Faktor-VIII-Moleküls, bei der zweiten Untersuchung war der REM-Wert mit o,45 leicht pathologisch. Bei dem Bruder (Pat. Nr. 9) fand sich bei beiden Untersuchungen ein normales Wanderungsverhalten des Faktor-VIII-Moleküls.

Eine Probenverwechselung bei Patientin Nr. 1o erscheint mit hoher Sicherheit ausgeschlossen, da die Faktor-VIII-Werte in beiden Proben eine große Übereinstimmung zeigten. Weiterhin konnten in beiden Proben übereinstimmend mit der Blutgruppe der Patientin Serumeigen-

schaften der Blutgruppe O festgestellt werden, während sich bei den Familienangehörigen in beiden Proben Serumeigenschaften der korrekten Blutgruppe A fanden.
Zusätzlich haben wir aus beiden Proben der Patientin Nr. 1o mit Hilfe von chromogenen Substraten die proteolytische Aktivität bestimmt. Verwendet wurden hierfür die Substrate S2238, S2251 und S216o. Mit keinem dieser Substrate konnte eine wesentliche proteolytische Aktivität in den Proben festgestellt werden.

Abschließend sei noch darauf hingewiesen, daß bei keinem der untersuchten Patienten ein Präzipitat des Faktor-VIII-Moleküls im Bereich der Auftragsstelle, wie von BOWIE und FASS (4) beschrieben, beobachtet werden konnte.

3.3.5 Wanderungsverhalten des Faktor-VIII-Moleküls bei nicht erkrankten Familienangehörigen der Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung

Im Rahmen von Familienuntersuchungen konnte auch bei insgesamt 2o nicht erkrankten Angehörigen der Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung das Wanderungsverhalten

des Faktor-VIII-Moleküls untersucht werden. Hierbei fanden sich bei 12 Probanden REM-Werte im Normbereich zwischen o,34 und o,44. Bei den restlichen 8 Angehörigen waren die REM-Werte diskret erniedrigt in einen Bereich zwischen o,3o und o,33. Eine Verlängerung der REM-Werte konnte in keinem Fall beobachtet werden.

Unter den untersuchten Familienangehörigen befand sich auch eine zweite Tochter des Patienten Nr. 2o, bei dem ein pathologisches Wanderungsverhalten des Faktor-VIII-Moleküls nachgewiesen werden konnte. Der REM-Wert lag bei ihr mit o,38 sicher im Normbereich.

Weitere Verwandte zu dieser Kleinfamilie oder zu den Patienten Nr. 8, 9, 1o bzw. 45 und 46 konnten nicht untersucht werden.

Die REM-Werte der untersuchten Familienangehörigen sind hier nicht im einzelnen aufgelistet.

3.4. Genetische Daten der Patienten

Die genetischen Daten der vier untersuchten Großfamilien sind nachstehend aufgeführt.

Sippe K.
========

Bei der Sippe K. handelt es sich um eine sehr umfangreiche Großfamilie, die aber nicht vollständig untersucht werden konnte. Bei insgesamt 22 untersuchten Familienangehörigen fanden sich 7 Erkrankungsfälle (≙ 32%).

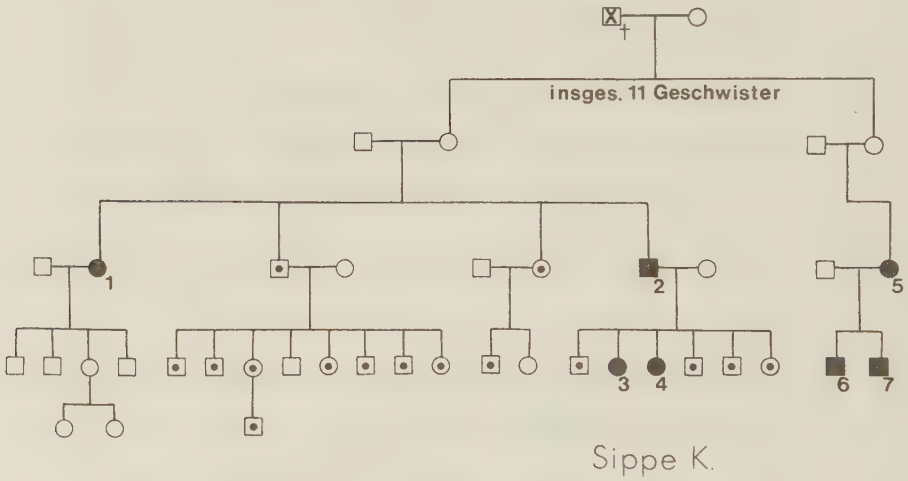


Abb.33: Genetische Daten der Sippe K.
(□= männlich, ○= weiblich,
□= nicht untersucht, keine Blutungsneigung bekannt,
⊠= nicht untersucht, Blutungsneigung bekannt,
⊡= untersucht, gesund,
■= untersucht, krank,
1 lfd.Nr. aus Tab. 1
†= an Blutungen verstorben)

Sippe D.

Bei der Sippe D. konnten alle lebenden Familienangehörigen untersucht werden. Hier fanden sich unter 15 untersuchten Familienangehörigen 9 Erkrankungsfälle (≙ 6o%).

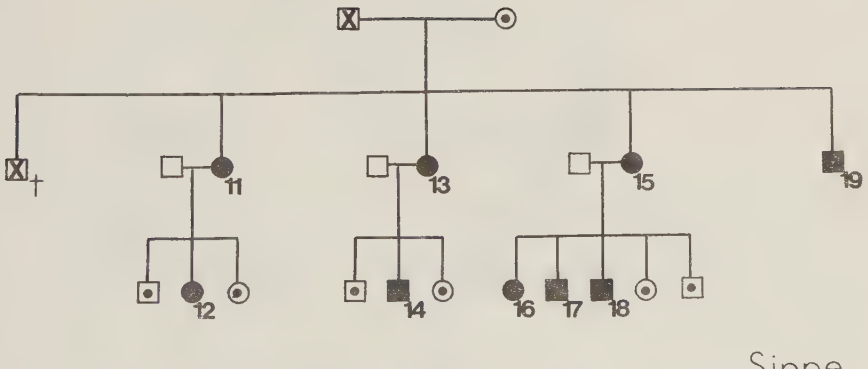
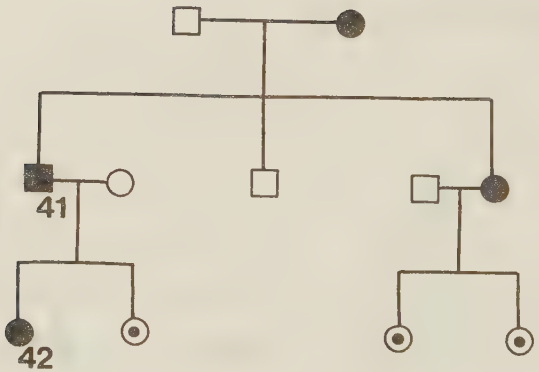


Abb.34: Genetische Daten der Sippe D.

Sippe Sch.
==========

Bei der kleineren Sippe Sch. fanden sich unter 7 untersuchten Angehörigen 4 Erkrankungsfälle (≙ 57%).



Sippe Sch.

Abb.35: Genetische Daten der Sippe Sch.

Sippe H.
========

Aus der Sippe H. gelangte lediglich eine Teilfamilie zur Untersuchung. Berücksichtigt man hier die anamnestischen Angaben zur Blutungsneigung bei den anderen Familienangehörigen, ist mit 8 Erkrankungsfällen unter 12 direkten Familienangehörigen zu rechnen (≙ 75%).

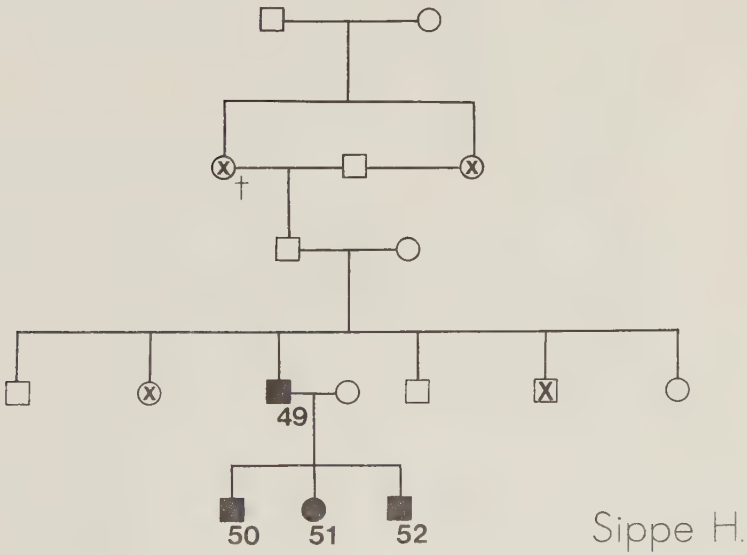


Abb.36: Genetische Daten der Sippe H.

4. DISKUSSION

Die von-Willebrand-Erkrankung ist allgemein gekennzeichnet durch eine starke intra- und interindividuelle Streuung der pathologischen Parameter.
Anhand eines großen Patientenkollektivs mit gesicherter von-Willebrand-Erkrankung sollte in dieser Arbeit zunächst die Aussagekraft der einzelnen diagnostischen Parameter dargelegt werden.
Hierbei bestätigte sich die hohe diagnostische Wertigkeit des Faktor-VIII-assoziierten Proteins, das in 85% der Untersuchungen pathologisch ausfiel.
Bei den insgesamt 8 Patienten mit normalem Ausfall des Faktor-VIII-AP liegt in 5 Fällen (Pat. Nr. 2o und 21; Nr. 28; Nr. 45 und Nr. 46) eine atypische Verlaufsform der von-Willebrand-Erkrankung vor, bei der - bei gleichbleibend hohem Faktor-VIII-AP und wechselnden Befunden der Faktor-VIII-Aktivität - die Störung der Thrombozytenfunktion im Vordergrund steht. Diese Befundkonstellation ist auch innerhalb der Familienverbände konstant wiederzufinden. Bei diesen Patienten muß also neben der begleitenden Störung der Faktor-VIII-Aktivität ein Defekt des Faktor-VIII-vWF angenommen werden.

Sippe H.
========

Aus der Sippe H. gelangte lediglich eine Teilfamilie zur Untersuchung. Berücksichtigt man hier die anamnestischen Angaben zur Blutungsneigung bei den anderen Familienangehörigen, ist mit 8 Erkrankungsfällen unter 12 direkten Familienangehörigen zu rechnen (≙ 75%).

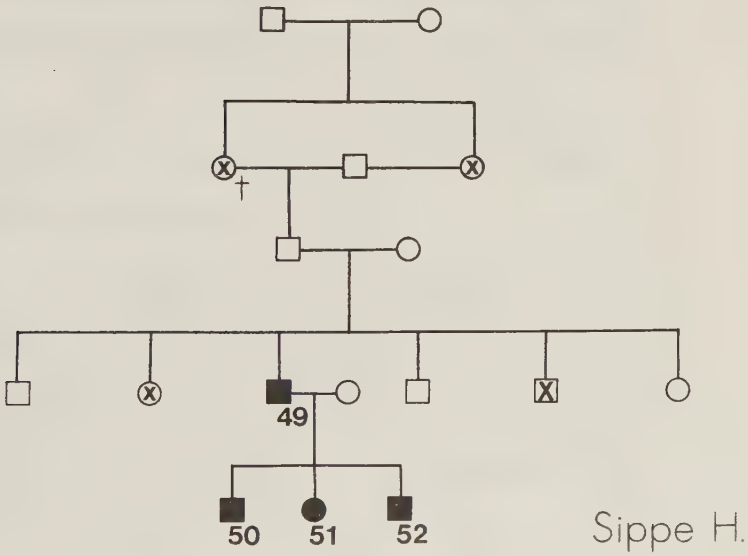


Abb.36: Genetische Daten der Sippe H.

4. DISKUSSION

Die von-Willebrand-Erkrankung ist allgemein gekennzeichnet durch eine starke intra- und interindividuelle Streuung der pathologischen Parameter.
Anhand eines großen Patientenkollektivs mit gesicherter von-Willebrand-Erkrankung sollte in dieser Arbeit zunächst die Aussagekraft der einzelnen diagnostischen Parameter dargelegt werden.
Hierbei bestätigte sich die hohe diagnostische Wertigkeit des Faktor-VIII-assoziierten Proteins, das in 85% der Untersuchungen pathologisch ausfiel.
Bei den insgesamt 8 Patienten mit normalem Ausfall des Faktor-VIII-AP liegt in 5 Fällen (Pat. Nr. 2o und 21; Nr. 28; Nr. 45 und Nr. 46) eine atypische Verlaufsform der von-Willebrand-Erkrankung vor, bei der - bei gleichbleibend hohem Faktor-VIII-AP und wechselnden Befunden der Faktor-VIII-Aktivität - die Störung der Thrombozytenfunktion im Vordergrund steht. Diese Befundkonstellation ist auch innerhalb der Familienverbände konstant wiederzufinden. Bei diesen Patienten muß also neben der begleitenden Störung der Faktor-VIII-Aktivität ein Defekt des Faktor-VIII-vWF angenommen werden.

Bei den übrigen 3 Patienten mit normalem Ausfall des Faktor-VIII-AP handelt es sich um blande Verlaufsformen der von-Willebrand-Erkrankung mit wechselnden Ergebnissen bei den Routinetests.
Häufig steht bei den blanden Verlaufsformen der Erkrankung allerdings gerade der pathologische Ausfall des Faktor-VIII-AP im Mittelpunkt des Befundspektrums (siehe z.B. Pat. Nr. 18).
Nachteilig ist aber der erhebliche technische Aufwand, der die Bestimmung bisher nur für speziell ausgerüstete Labors verfügbar macht. Auch der Zeitaufwand ist beachtlich, da die Testdurchführung insgesamt zwei Tage beansprucht und die Untersuchung aus Kostengründen und wegen des technischen Aufwandes nur in größeren Abständen durchgeführt werden dürfte.

Als ebenfalls sehr empfindlicher Test für die Diagnostik der von-Willebrand-Erkrankung erwies sich die Bestimmung der Thrombozytenretention, die bei 89% der Untersuchungen ein pathologisches Ergebnis zeigte.
Die diagnostische Wertigkeit entspricht also derjenigen des Faktor-VIII-AP.

Diese Ergebnisse entsprechen denjenigen der kooperativen Studie von SALZMAN (32) und der Untersuchung von NIESSNER (29), bei denen ebenfalls bei 85 bzw. 82% der Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung eine pathologische Thrombozytenretention gefunden wurde.
Ein pathologischer Ausfall der Thrombozytenretention ist allerdings nicht spezifisch für die von-Willebrand-Erkrankung. Neben der hereditären Thrombasthenie Glanzmann führen auch erworbene Thrombopathien (z.B. bei der Urämie, beim M. Waldenström und bei anderen hämatologischen Systemerkrankungen) zu einem pathologischen Ausfall.
Gegenüber der Bestimmung des Faktor-VIII-AP ist die Thrombozytenretention aber ausgesprochen einfach und ohne großen apparativen Aufwand meßbar. Der Test ist aus diesen Gründen auch für ein Routinelabor ohne spezielle gerinnungsphysiologische Ausrichtung durchführbar.
Die Messung der Thrombozytenretention bietet sich also als Übersichtstest zum Ausschluß einer Thrombopathie bzw. der von-Willebrand-Erkrankung an. Bei einem pathologischen Ergebnis müssen dann weiterreichende gerinnungsphysiologische Untersuchungen angeschlossen werden.

Bei der Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation ist die Häufigkeit der pathologischen Befunde deutlich abhängig von der verwendeten Testdosis. Dies entspricht auch den Ergebnissen anderer Untersucher (23, 38). Die alleinige Austestung mit einer einzigen, hoch gewählten Testdosis (z.B. 1,4 oder 1,6 mg/ml) ist unbefriedigend. Insgesamt erscheint die Durchführung der Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation mit mindestens zwei verschiedenen, niedrig angesetzten Testdosen als die günstigste Methode. Bei einem pathologischen Ergebnis sollten dann weitere Untersuchungen mit höheren Dosen angeschlossen werden. Mit diesen Maßnahmen läßt sich bei etwa dreiviertel der von uns untersuchten Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung ein pathologischer Befund erheben.
Diese Ergebnisse entsprechen auch den Angaben in der Literatur. Von verschiedenen Untersuchern wurde bei Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung in einer Häufigkeit von 16 bis 36% der Fälle ein normales Ergebnis der Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation gefunden. Ein Überblick über diese Untersuchungsergebnisse ist in der Arbeit von L.W.HOYER enthalten (12).

Die Bestimmung der Faktor-VIII-Aktivität zeigt ebenfalls bei etwa dreiviertel der Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung ein pathologisches Ergebnis. Hierbei finden sich aber nicht selten nur leicht pathologische Werte zwischen 6o und 7o% der Norm. Bei diesem Test kommt also der Beachtung des leicht pathologischen Bereiches besondere Bedeutung zu. Gegenüber den hier gefundenen Ergebnissen gibt NIESSNER mit 85% pathologischen Befunden bei Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung eine noch höhere diagnostische Wertigkeit der Faktor-VIII-Aktivität an (23).
Bemerkenswert ist innerhalb unseres Patientenkollektivs die niedrige diagnostische Aussagekraft der subaqualen Blutungszeit. Insgesamt fand sich bei etwa 2/3 der Patienten eine normale Blutungszeit.
Dieses vergleichsweise schlechte Ergebnis hat nach unserem Dafürhalten zwei Gründe. Erstens sind in der Untersuchung die leichten oder mäßig ausgeprägten Fälle überdurchschnittlich vertreten, bei denen auch nach anderen Mitteilungen die Messung der Blutungszeit subagual oder nach DUKE keine befriedigenden Ergebnisse liefert (23).

Zweitens erfolgten die Untersuchungen überwiegend als Routineuntersuchungen im blutungsfreien Intervall. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Fälle Nr. 21 und Nr. 37.

Bei beiden Patienten lag die Blutungszeit bei der ersten Untersuchung, die während eines blutungsfreien Intervalls erfolgte, im Normbereich. Bei der zweiten Untersuchung, zu der sich die Patienten wegen Blutungskomplikationen vorstellten (in dem einen Fall eine schwere gynäkologische Blutung, in dem anderen Fall lang anhaltendes Nasenbluten), war die Blutungszeit mit $>$ 1o Minuten deutlich verlängert.

Diese Fälle geben also einen Hinweis darauf, daß die Bestimmung der Blutungszeit subaqual oder nach DUKE bei Blutungskomplikationen die Verschlechterung der hämostaseologischen Gesamtsituation korrekt wiederspiegelt. Bei Untersuchungen im blutungsfreien Intervall wäre aber der Methode nach IVY oder BORCHGREVINK der Vorzug zu geben (25).

Ungeachtet der unterschiedlichen Wertigkeit der einzelnen diagnostischen Parameter sollte zur Sicherung der von-Willebrand-Erkrankung nach Möglichkeit das ganze Spektrum der Laboruntersuchungen eingesetzt werden (12, 23).

Dies ist insbesondere bei atypischen oder blanden Verlaufsformen von Bedeutung, die sich andernfalls dem Nachweis entziehen können.
Bei unklaren Befunden sind wiederholte Kontrolluntersuchungen zur Sicherung der Diagnose angezeigt. Diese Kontrolluntersuchungen sollten möglichst während eines Blutungsintervalls durchgeführt werden, da zu diesem Zeitpunkt pathologische Ergebnisse der Laboruntersuchungen am wahrscheinlichsten sind (siehe Pat. Nr. 21 und Nr. 37).

Die zweite Fragestellung der Arbeit betraf die Einordnung der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation in den Formenkreis der von-Willebrand-Erkrankung und der Thrombopathien allgemein.

Arachidonsäure löst in einem weiten Konzentrationsbereich zwischen $4{,}8 \times 10^{-4}$ und $1{,}2 \times 10^{-3}$ mol eine typische Aggregationsreaktion aus, die gekennzeichnet ist durch Formwandel und monophasische, irreversible Aggregation der Thrombozyten (18, 33). Die Reaktion folgt im wesentlichen einem Alles-oder-Nichts-Gesetz und bleibt bis 4 Stunden nach der Blutentnahme weitgehend stabil.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse liegt in einem für Thrombozytenaggregationstests üblichen Bereich. Bemerkenswert sind allerdings isolierte, unspezifisch pathologische Resultate der Arachidonsäure-induzierten Aggregation in den verdünnten Plasmaproben, die im unverdünnten PRP nicht nachweisbar waren. Hier dürfte es sich am ehesten um eine sekundäre Hemmung der Aggregation durch (aus Thrombozyten?) freigesetzte Substanzen handeln. Es gelang uns aber letztlich nicht, die Kausalität dieser unspezifisch pathologischen Reaktion zu klären.

Bei den Überlegungen über die Biochemie und Pathobiochemie der Thrombozytenaggregation erweist sich die Arachidonsäure als Träger der vitalen Thrombozytenreaktion. Bereits von diesem Ansatzpunkt aus erscheint eine Einschränkung der Arachidonsäure-induzierten Aggregation bei der von-Willebrand-Erkrankung als unwahrscheinlich, da bei dieser Erkrankung nach allgemeiner heutiger Auffassung keine primäre Thrombopathie vorliegt. Diese Auffassung ließ sich bei unseren Untersuchungen deutlich bestätigen. Ein pathologischer Ausfall der Arachidonsäure-induzierten Aggregation

konnte bei Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung nur vereinzelt festgestellt werden. Hierbei fand sich stets auch eine Einschränkung der übrigen Thrombozytenvitaltests, insbesondere der Kollagen-induzierten Aggregation, so daß bei diesen Fällen eine begleitende, exogene Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion, z.B. durch Medikamenteneinnahme anzunehmen ist, die nicht der von-Willebrand-Erkrankung zuzurechnen ist. Bei einer Kontrolluntersuchung eines dieser Patienten fand sich dann auch ein völlig normaler Ausfall sowohl der Arachidonsäure- als auch der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation.

Auch bei nicht erkrankten Familienangehörigen der Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung ließ sich eine Einschränkung der Arachidonsäure-induzierten Aggregation nicht sichern.

Es fand sich dagegen regelmäßig ein pathologischer Ausfall der Reaktion bei primären Thrombopathien.

Bei Patienten mit hereditärer Thromboasthenie Glanzmann kam entsprechend den Ergebnissen der Kollagen-induzierten Aggregation ein gut ausgeprägter, isolierter Formwandel zur Darstellung, bei völligem Ausfall der Aggregationsreaktion.

Auch mit höheren Testdosen (4 µg/ml Kollagen bzw. 1,2 x $1o^{-3}$ mol Arachidonsäure) konnte keine Aggregation ausgelöst werden. Diese Befunde entsprechen den heutigen Vorstellung über die Kausalität der Erkrankung, bei der ein Defekt des kontraktilen Proteins der Thrombozytenmembran angenommen wird, während die biochemischen Abläufe des Formwandels und der Aggregationsreaktion nicht gestört sind (4o, 41).
Die Familienangehörigen dieser Patienten, bei denen keine Blutungsneigung bestand, zeigten keinerlei Einschränkung der Thrombozytenfunktion, obwohl bei zwei Probanden aufgrund des Erbgangs eine heterozygote Anlage der Erkrankung angenommen werden muß. Es bestätigt sich also auch bei dieser Untersuchung, daß sich der heterozygote Zustand der hereditären Thrombasthenie dem diagnostischen Nachweis entzieht (41).

Bei Patienten, die die Thrombozytenaggregation hemmende Medikamente eingenommen hatten, zeigte sich nahezu uniform ein völliges Erlöschen sowohl des Formwandels als auch der Aggregationsreaktion nach Arachidonsäurereiz. Dies entspricht früher mitgeteilten Befunden (33). Demgegenüber waren die entsprechenden Reaktionen nach Kollagenzugabe zwar ebenfalls pathologisch, aber ins-

gesamt noch deutlich nachweisbar. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation ist also offenkundig zwingend auf das Enzymsystem der Cyclooxygenase angewiesen und daher durch Medikamente, die dieses Enzym spezifisch blockieren (z.B. Acetylsalicylsäure), vollständig unterdrückbar. Demgegenüber ist die Kollagen-induzierte Aggregation durch diese Medikamente nicht vollständig hemmbar, was auf andere Aktivierungswege der Reaktion neben dem Cyclooxygenase-System hindeutet.
Insgesamt entsprachen also die Ergebnisse der Arachidonsäure-induzierten Aggregation weitgehend denjenigen der Kollagen-induzierten Aggregation. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation zeigt allerdings medikamentöse Beeinträchtigungen der Prostaglandinsynthese (Hemmung der Cyclooxygenase) deutlich empfindlicher an. Zum Nachweis solcher Medikamenteneffekte bietet sich diese neue Methode daher an.
Bei den übrigen Krankheitsbildern ergibt sich aber aus der zusätzlichen Bestimmung der Arachidonsäure-induzierten Aggregation keine weiterreichende diagnostische oder pathogenetische Aussage.

Bei den Untersuchungen über das Wanderungsverhalten des Faktor-VIII-Moleküls mit Hilfe der zweidimensionalen

Immunelektrophorese zeigte sich auch bei uns die in der Literatur beschriebene Asymmetrie des Faktor-VIII-Präzipitates mit einer Verschiebung zu den kathodennahen und einer relativen Verminderung der anodennahen Anteile (35).

Diese Asymmetrie ist aber deutlich konzentrationsabhängig und nimmt mit abnehmender Faktor-VIII-Konzentration in der Probe deutlich ab. Bei einer Konzentration des Faktor-VIII-AP entsprechend 12,5% ist sie völlig geschwunden. Diese Befunde widersprechen scheinbar den Beobachtungen von SULTAN und Mitarb., die bei der Verdünnung der untersuchten Plasmaproben keine Änderung der Form des Faktor-VIII-Präzipitates feststellen konnten (35). Bei dieser Untersuchung wurden die Plasmaproben aber nur im Verhältnis 1:2 mit Pufferlösung verdünnt (entsprechend einer verbleibenden Konzentration des Faktor-VIII-AP von 5o%). Weiterreichende Plasmaverdünnungen, bei denen auch in unserer Untersuchung die Veränderung des Faktor-VIII-Präzipitates erst ersichtlich wurde, gelangten nicht zur Darstellung. Die Unterschiede zu dieser Studie werden also im wesentlichen durch die stärkere Verdünnung der Plasmaproben erklärt.

Diese Beobachtung verdient besondere Beachtung bei der Auswertung der Befunde, da bei einer niedrigen Konzentration des Faktor-VIII-AP und einer entsprechend flachen Ausprägung des Präzipitates eine schnellere Beweglichkeit des Faktor-VIII-Moleküls vorgetäuscht wird, falls man, wie allgemein üblich, den Gipfel des Präzipitates zur Auswertung verwendet.

Bei Verwendung eines Markerproteins (hier alpha-1-Antitrypsin) ist die Streuung der Meßwerte innerhalb eines Normalkollektivs mit einem Variationskoeffizienten von 6,4% für immunologische Tests sehr niedrig.

Bei der Analyse der einzelnen Patienten fällt bei einigen Proben eine leicht verminderte Wanderungsgeschwindigkeit des Faktor-VIII-Moleküls auf. Da sich dieser Effekt sowohl bei Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung als auch bei nicht erkrankten Familienangehörigen findet, dürfte es sich hier am ehesten um eine unspezifische Aggregatbildung des Faktor-VIII-Moleküls während der Lagerungszeit der Proben handeln.

Unter den Patienten mit einer abnorm schnellen Beweglichkeit des Faktor-VIII-Moleküls fand sich in einem Fall (Pat. Nr. 14) ein leicht pathologischer REM-Wert

von o,45. Hier war das Präzipitat wegen des sehr niedrigen Faktor-VIII-AP-Gehaltes aber sehr flach ausgeprägt. Der Befund erscheint aufgrund der oben beschriebenen Störungsmöglichkeit bei niedrigen Faktor-VIII-Präzipitaten unsicher, zumal sich bei keinem der miterkrankten Familienangehörigen des Patienten ein entsprechendes Ergebnis sichern ließ.

Bemerkenswert sind die Befunde bei Patientin Nr. 1o. Hier fand sich in der ersten asservierten Probe ein hochpathologisches Wanderungsverhalten des Faktor-VIII-Moleküls (REM-Wert = o,59). Aus der Probe eines zweiten Untersuchungstermins wurde das Wanderungsverhalten dagegen als völlig normal bestimmt (REM-Wert = o,38). Durch die Kontrolle der Faktor-VIII-Qualitäten sowie die Überprüfung der Serumeigenschaften im ABO-Blutgruppensystem erscheint die Identität der Patientin in beiden Proben gesichert.
Obwohl wir mit chromogenen Substraten in beiden Proben keine vermehrte proteolytische Aktivität nachweisen konnten, erscheint uns eine abgelaufene Proteolyse in der ersten Probe, die zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung nicht mehr nachweisbar war, als die günstigste Erklärung für diesen überraschenden Befund.

Eine zeitlich begrenzte Synthese eines abnormen Faktor-VIII-Moleküls bei der von-Willebrand-Erkrankung ist dagegen schwer vorstellbar.
In der bekannten Literatur ist ein ähnlicher Befund an keiner Stelle beschrieben. Da bei allen Untersuchungen aber lediglich Einzelbestimmungen durchgeführt wurden, ist dringend eine Kontrolle der pathologischen Befunde zu verschiedenen Zeitpunkten zu fordern.
Unter den miterkrankten Familienangehörigen der oben beschriebenen Patientin ergab sich lediglich bei der Mutter (Pat. Nr. 8) aus der ersten asservierten Probe ein leicht pathologischer REM-Wert von o,45. Das Ergebnis ließ sich aus der Probe eines zweiten Untersuchungstermins nicht bestätigen. Auch dieser Befund erscheint insgesamt unsicher, zumal das Präzipitat in beiden Fällen wegen des niedrigen Faktor-VIII-AP-Gehaltes nur flach ausgeprägt war.

Deutlich pathologische REM-Werte zwischen o,45 und o,51 fanden sich aber in einer Gruppe von Patienten, die an einer atypischen Verlaufsform der von-Willebrand-Erkrankung litten (Pat. Nr. 2o und Nr. 21; Nr. 45 und Nr. 46). Als konstanter Befund innerhalb der Familienverbände und bei wiederholten Untersuchungen desselben

Probanden ergab sich hier eine hohe Konzentration des Faktor-VIII-AP bei wechselnden Ergebnissen hinsichtlich der Faktor-VIII-Aktivität. Gleichzeitig waren die Thrombozytenretention und die Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation typisch gestört, bei der Bestimmung der Blutungszeit ergaben sich bei wiederholten Untersuchungen wechselnde Ergebnisse. Alle Patienten klagten über Blutungsbeschwerden, wie sie für die von-Willebrand-Erkrankung typisch sind. Legt man der gestörten Thrombozytenfunktion der Patienten eine Störung des Faktor-VIII-vWF zugrunde, so ergibt sich aus den immunelektrophoretischen Untersuchungen des Faktor-VIII-Moleküls, daß innerhalb dieses Patientenkollektivs ein qualitativer Defekt des Faktor-VIII-AP angenommen werden muß, bei normaler Konzentration an Faktor-VIII-AP, und daß die Qualität des Faktor-VIII-vWF eng mit dem Faktor-VIII-assoziierten Protein verknüpft ist. Bereits KERNOFF hatte auf diese Schlußfolgerung hingewiesen (17).

Bei einem weiteren Patienten mit demselben Befundmuster (Pat. Nr. 28) war das Wanderungsverhalten des Faktor-VIII-Moleküls aber normal (REM-Wert = o,41). Eine Störung des Faktor-VIII-vWF ist also nicht in jedem

Fall mit einem qualitativen Defekt des Faktor-VIII-AP verbunden.

Der qualitative Defekt des Faktor-VIII-AP ist innerhalb der Familienverbände konstant angelegt, er variiert aber zwischen den einzelnen Familien (REM-Werte bei Pat. Nr. 2o und Nr. 21 - o,46 bzw. o,45; bei Pat. Nr. 45 und Nr. 46 - o,51 bzw. o,5o). Dem pathologischen Bild müssen also von Familie zu Familie unterschiedliche, genetisch determinierte Veränderungen des Faktor-VIII-Moleküls zugrunde liegen (36).
Als Ursache für die abnorm schnelle Beweglichkeit des Faktor-VIII-Moleküls wird in der Literatur überwiegend eine verminderte Molekülmasse des Faktor-VIII-AP angenommen (12). Dem pathologischen Bild läge danach letztlich ein Polymerisationsdefekt des Faktor-VIII-Moleküls zugrunde.
Diese Überlegung ist allerdings nicht zwingend. Als zweite Erklärungsmöglichkeit bieten sich Veränderungen in der Molekülstruktur des Faktor-VIII-AP-Monomers an, die eine Änderung des Ladungszustandes und damit der elektrophoretischen Mobilität des Gesamtproteins bewirken. Bereits KERNOFF hatte auf die Möglichkeit von geringen Strukturänderungen innerhalb des Moleküls

als Erklärung einer veränderten Immunogenität des Proteins hingewiesen (17). Eine endgültige Klärung dieser Frage ist bisher nicht erfolgt.

Bei dem oben beschriebenen Patientenkollektiv mit einer abnorm schnellen Beweglichkeit des Faktor-VIII-Moleküls findet sich dasselbe pathologische Muster der Erkrankung wie bei den Patienten von KERNOFF (17) bzw. von PEAKE (27). Auch bei den Patienten der meisten anderen Untersucher (5, 34, 36) stand die Erniedrigung des Faktor-VIII-vWF und die resultierende Störung der Thrombozytenfunktion bei normalem oder nur gering erniedrigtem Faktor-VIII-AP-Gehalt im Vordergrund des pathologischen Bildes. Gerade innerhalb dieses Patientenkollektivs erscheint die Durchführung der zweidimensionalen Immunelektrophorese des Faktor-VIII-Moleküls besonders sinnvoll, da hier qualitative Defekte des Faktor-VIII-AP häufig in Erscheinung treten. Die Bestimmung kann bei diesen Patienten wegen des gut ausgeprägten Faktor-VIII-Präzipitates auch technisch zuverlässig durchgeführt werden.

Bei einer ausgeprägten Erniedrigung des Faktor-VIII-AP treten dagegen zunehmend technische Schwierigkeiten wegen der flachen Ausprägung des Präzipitates auf.

Bei diesen Patienten bietet die von ZIMMERMAN beschriebene (45) radioimmunologische Methode die Möglichkeit einer weiterreichenden pathogenetischen Abklärung. Wegen des erheblichen technischen Aufwandes ist die Methode bisher aber nur an wenigen Zentren verfügbar.
Ein Präzipitat des Faktor-VIII-Moleküls im Bereich der Auftragsstelle konnte in dieser Untersuchung weder bei Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung, noch bei den nicht erkrankten Familienangehörigen dieser Patienten nachgewiesen werden. Wir konnten daher die Beobachtung von BOWIE und FASS (4) nicht bestätigen.

Bei der Betrachtung der genetischen Daten der Patienten zeigt sich in allen vier untersuchten Großfamilien der autosomal-dominante Erbgang mit einer relativen Häufigkeit der Erkrankungsfälle zwischen 32 und 75% der Familienangehörigen.
Bei der Sippe K. konnten allerdings einige Angehörige bisher nicht untersucht werden. Innerhalb dieser Familie ist unter den Kindern der Patientin Nr. 1 mit weiteren Erkrankungsfällen zu rechnen.
Insbesondere anhand der vollständig untersuchten Sippe D. läßt sich auch die variable Expressivität der klinischen

Erscheinungen und der Laborparameter deutlich erkennen. So finden sich bei Pat. Nr. 18 trotz der typischen Veränderungen bei den übrigen erkrankten Familienangehörigen nur gering pathologische Befunde. Eine Diagnosestellung wäre in diesem Fall, ohne Beachtung der Familienanamnese, kaum möglich. Offenkundig liegt hier eine sehr leichte Variante der von-Willebrand-Erkrankung vor, was auf einen fließenden Übergang der pathologischen Befunde in den Normbereich hindeutet.
Auch die klinischen Erscheinungen der Erkrankung sind innerhalb dieser Familie sehr unterschiedlich ausgeprägt. Einerseits wird von einem Teil der Familienangehörigen (z.B. Pat. Nr. 13 und Nr. 14) trotz typischer Laborveränderungen anamnestisch keine Blutungsneigung angegeben. Bei Patient Nr. 19 besteht dagegen bei ähnlichen Laborbefunden eine ausgeprägte Blutungsneigung. Zudem ist der älteste Bruder aus dieser Generation vor einigen Jahren an Blutungskomplikationen verstorben.
Aus dem verbleibenden Patientenkollektiv ist bemerkenswert die Diskrepanz zwischen den hochpathologischen Befunden der Patientin Nr. 36 und den geringen Veränderungen bei der Mutter (Pat. Nr. 37). Die klinischen Erscheinungen der Erkrankung entsprechen bei diesen Patienten den Laborveränderungen. Während von der Mutter keine

Blutungsneigung angegeben wird, besteht bei der Tochter eine ausgeprägte Blutungsneigung unter Einschluß von Gelenkblutungen nach geringen Traumen. Entsprechend der Mitteilung von SULTAN (35) muß hier eine homozygote Verlaufsform bei Patientin Nr. 36 sowie eine heterozygote Anlage der Erkrankung bei der Mutter angenommen werden. Eine Untersuchung des Ehemannes der Patientin Nr. 37 oder weiterer Familienangehöriger war bisher aber nicht möglich.

Auch bei dem Patienten Nr. 23 und der Patientin Nr. 43 muß wegen des sehr schweren Krankheitsbildes eine homozygote Verlaufsform der Erkrankung in Betracht gezogen werden. In beiden Fällen war bei den Eltern keine Blutungsneigung bekannt. Eine weiterreichende genetische Abklärung war aber nicht möglich, da alle Elternteile wegen des fortgeschrittenen Alters bereits verstorben sind.

5. ZUSAMMENFASSUNG

5.1. Zur Untersuchung gelangten 52 Patienten mit gesicherter von-Willebrand-Erkrankung. Diese entstammten einerseits aus vier Großfamilien, andererseits waren es Einzelfälle oder kleine Familienverbände.
Insgesamt entfielen auf die 52 Patienten 78 einzelne Untersuchungstermine, da ein Teil der Patienten ein zweites Mal untersucht werden konnte.

5.2. Als empfindlichste Tests für die Diagnostik der von-Willebrand-Erkrankung erwiesen sich die Bestimmung des Faktor-VIII-AP und der Thrombozytenretention, die in 85% bzw. 89% der Untersuchungen ein pathologisches Ergebnis zeigten.
Für ein Routinelabor ohne spezielle gerinnungsphysiologische Ausrichtung bietet sich die Thrombozytenretention wegen des geringen technischen Aufwandes als Übersichtstest zum Ausschluß einer Thrombopathie bzw. der von-Willebrand-Erkrankung an.

5.3. Bei der Ristocetin-induzierten Thrombozytenaggregation sollte in jedem Fall eine möglichst niedrige Testdosis

gewählt werden. Die Austestung mit mindestens zwei verschiedenen Testdosen erwies sich hierbei als besonders günstig. Unter diesen Bedingungen läßt sich bei etwa dreiviertel der Patienten mit von-Willebrand-Erkrankung ein pathologischer Befund erheben.

5.4. Eine Erniedrigung der Faktor-VIII-Aktivität fand sich ebenfalls bei etwa dreiviertel der untersuchten Patienten. Hierbei verdient der leicht pathologische Bereich besondere Bedeutung, da die Befunde auch bei Patienten mit deutlich ausgeprägter von-Willebrand-Erkrankung nicht selten in diesem Bereich lagen.

5.5. Bei der Bestimmung der Blutungszeit sollte für die Abklärung des Krankheitsbildes im blutungsfreien Intervall den Methoden von IVY bzw. BORCHGREVINK der Vorzug gegeben werden. Die subaquale Messung liefert hier nur unzuverlässige Ergebnisse. Diese Methode ist aber für die Beurteilung der akuten Blutungsgefährdung der Patienten gut geeignet.

5.6. Zur Sicherung der von-Willebrand-Erkrankung sollte nach Möglichkeit das ganze Spektrum der Laborunter-

suchungen eingesetzt werden, da sich atypische oder blande Verlaufsformen andernfalls dem Nachweis entziehen können. Bei unklaren Befunden sind wiederholte Kontrolluntersuchungen zur Sicherung der Diagnose angezeigt. Diese sollten möglichst während eines Blutungsintervalls durchgeführt werden, da zu diesem Zeitpunkt pathologische Ergebnisse am wahrscheinlichsten sind.

5.7. Die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation erwies sich, wie bereits nach den Überlegungen über die Biochemie der Thrombozytenaggregation vermutet, als Test für die Vitalfunktion der Thrombozyten. Ein pathogenetischer Zusammenhang mit der von-Willebrand-Erkrankung ließ sich nicht sichern. Vereinzelte pathologische Ausfälle der Reaktion waren stets gekoppelt mit zusätzlichen Einschränkungen der übrigen Thrombozytenvitaltests, so daß hier eine begleitende, exogene Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion angenommen werden muß, die nicht der von-Willebrand-Erkrankung zuzurechnen ist.
Es fanden sich dagegen typische Störungen der Aggregation bei der hereditären Thrombasthenie Glanzmann und nach der Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern (z.B. Acetylsalicylsäure).

Hierbei entsprachen die Ergebnisse der Arachidonsäure-induzierten Aggregation weitgehend denjenigen nach Kollagenreiz. Medikamentöse Beeinträchtigungen der Cyclooxygenase werden aber von der Arachidonsäure-induzierten Aggregation deutlich empfindlicher angezeigt.

5.8. Bei der zweidimensionalen Immunelektrophorese des Faktor-VIII-Moleküls ließ sich eine abnorm schnelle Beweglichkeit des Proteins als konstanter Befund lediglich in einer Gruppe von Patienten sichern, die an einer atypischen Verlaufsform der von-Willebrand-Erkrankung litten. Bei diesen Patienten muß neben der Störung des Faktor-VIII-vWF ein qualitativer Defekt des Faktor-VIII-AP bei normaler Menge an Faktor-VIII-AP angenommen werden. Der qualitative Defekt des Faktor-VIII-AP ist innerhalb der Familienverbände konstant angelegt, variiert aber zwischen den einzelnen Familien.
Innerhalb eines solchen Patientenkollektivs sollte die zweidimensionale Immunelektrophorese des Faktor-VIII-Moleküls in das Routineprogramm übernommen werden, da aus der Bestimmung eine zusätzliche diagnostische und pathogenetische Information zu erwarten ist.

5.9. Bei den übrigen Patienten ließ sich lediglich in zwei Fällen ein leicht pathologisches Wanderungsverhalten des Faktor-VIII-Moleküls sichern. Wegen der Geringfügigkeit und Inkonstanz dieser Ergebnisse erscheint die pathogenetische Bedeutung aber fragwürdig.

5.1o. Bemerkenswert ist die Diskrepanz der Befunde, die sich in einem Fall bei zwei verschiedenen Untersuchungen ergab. Als Erklärung hierfür wurde eine Proteolyse während der Lagerungszeit der Probe angenommen. Wegen der Möglichkeit solcher sekundärer Veränderungen in der Probe muß allgemein eine Überprüfung der pathologischen Befunde durch Kontrolluntersuchungen gefordert werden.

5.11. Als Ursache für die abnorm schnelle Beweglichkeit des Faktor-VIII-Moleküls wird überwiegend eine verminderte Molekülmasse des Faktor-VIII-AP angenommen. Als zweite Erklärungsmöglichkeit bieten sich Veränderungen in der Molekülstruktur des Faktor-VIII-AP-Monomers an, die eine Änderung des Ladungszustandes des Gesamtproteins bewirken. Eine endgültige Klärung dieser Frage ist bisher nicht erfolgt.

5.12. Ein Präzipitat des Faktor-VIII-Moleküls im Bereich der Auftragsstelle konnte bei keinem der untersuchten Patienten nachgewiesen werden.

5.13. Bei der Betrachtung der genetischen Daten der Patienten zeigte sich in allen untersuchten Großfamilien der autosomal dominante Erbgang mit einer hohen Penetranz der Erbanlage. Auch die variable Expressivität der Erkrankung innerhalb derselben Familie ließ sich deutlich bestätigen.

5.14. Bei insgesamt drei untersuchten Patienten muß wegen des sehr schweren Krankheitsbildes eine homozygote Anlage der Erkrankung in Betracht gezogen werden. Hierbei ist in einem Fall bei der Mutter der Patientin eine heterozygote Verlaufsform mit nur geringen Veränderungen der Laborparameter anzunehmen. Bei den übrigen Elternteilen war eine genetische Abklärung nicht möglich.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1) ALEXANDER,B.; R.GOLDSTEIN:
Dual hemostatic defect in Pseudohemophilia.
J. Clin. Invest. 32 (1953), 551

2) BLOOM,A.L.; J.C.GIDDINGS; C.J.WILKS:
Factor VIII on the vascular intima: Possible importance in hemostasis and thrombosis.
Nature (New Biol.) 241 (1973), 217

3) BORN,G.V.R.:
Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets.
J. Physiology 162 (1962), 67 P.

4) BOWIE,W.; D.N.FASS:
Factor-VIII-related antigen (VIII R:AG) in hemophilic patients and in carriers.
Lancet II (1979), 1049

5) GREEN,D.; K.J.PHILIP:
Variant von Willebrand's disease.
A study emphasizing Crossed-Immunoelectrophoresis.
Thromb. Haemostas. 43 (1980), 2

6) HELLEM,A.J.:
The adhesiveness of human blood platelets in vitro.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 12 (Suppl. 51) (1960), 1

7) HELLEM,A.J.:
Platelet adhesiveness in von Willebrand's disease.
A study with a new modification of the glass bead filter method.
Scand. J. Haematol. 7 (1970), 374

8) HOLMBERG,L.; P.M.MANNUCCI; I.TURESSON; Z.M.RUGGERI, I.M.NILSSON:
Factor VIII antigen in the vessel walls in von Willebrand's desease and Haemophilia A.
Scand. J. Haemat. 13 (1974), 33

9) HOWARD,M.A.; B.G.FIRKIN:
Ristocetin: A new tool in the investigation of platelet aggregation.
Thromb. Diath. Haemorrh. 26 (1971), 362

1o) HOWARD,M.A.; R.J.SAWERS; B.G.FIRKIN:
Ristocetin: a means of differentiating von Willebrand's disease into two groups.
Blood 41 (1973), 687

11) HOYER,L.W.; R.P.DE LOS SANTOS; J.R.HOYER:
Antihemophilic factor antigen. Localization in endothelial cells by immunofluorescent microscopy.
J. Clin. Invest. 52 (1973), 2737

12) HOYER,L.W.:
Von Willebrand's disease.
In: SPAET,Th.H.: Progress in hemostasis and thrombosis.
Vol. 3 (1976), pp. 231 - 287

13) ITALIAN WORKING GROUP:
Spectrum of von Willebrand's disease: a study of 1oo cases.
Br. J. Haematol. 35 (1977), 97

14) JAFFE,E.A.; L.W.HOYER; R.L.NACHMAN:
Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells.
J. Clin. Invest. 52 (1973), 2757

15) JENKINS,C.S.P.; D.MEYER; M.D.DREYFUS; M.-J.LARRIEU:
Willebrand factor and Ristocetin.
Br. J. Haematol. 28 (1974), 561

16) JÜRGENS,R.; W.LEHMANN; O.WEGELIUS; u.a.:
Mitteilung über den Mangel an antihämophilem Globulin (Faktor VIII) bei der Aaländischen Thrombopathie (v. Willebrand-Jürgens).
Thromb. Diath. Haemorrh. 1 (1957), 257

17) KERNOFF,P.B.A.; R.GRUSON; C.R.RIZZA:
A variant of factor VIII related antigen.
Br. J. Haematol. 26 (1974), 435

18) KINLOUGH,R.L.; H.J.REIMERS; J.F.MUSTARD:
Sodium Arachidonate can induce platelet shape change and aggregation wich are independent of the release reaction.
Science 192 (1976), 1o11

19) LARRIEU,M.J.; J.P.SOULIER:
Deficit en facteur antihemophilic A chez une fille associé a un trouble du saignement.
Rev. Hematol. 8 (1953), 361

2o) LAURELL,C.-B.:
Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies.
Anal. Biochem. 15 (1966), 45

21) LAURELL,C.-B.:
Antigen-antibody crossed electrophoresis in clinical research.
In: Nobel Symposium 3, J.KILLANDER (Ed.)
Almqvist & Wicksell, Stockholm 1967, p. 295

22) NIESSNER,H.:
Messung der Plättchenadhäsivität mit einer modifizierten Form der Hellem II Methodik unter besonderer Berücksichtigung des von Willebrand-Jürgens Syndrom.
Thromb. Diath. Haemorrh. 27 (1972), 434

23) NIESSNER,H.:
Das analytische Spektrum zur Diagnostik des von Willebrand-Jürgens-Syndroms.
In: HEENE,D.L. (Ed.): Immunologische Probleme der Blutgerinnung. Von-Willebrand-Jürgens-Syndrom.
F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart 1978, pp. 199 - 2o9

24) NILSSON,I.M.; M.BLOMBÄCK; I.VON FRANCKEN:
On an inherited autosomal hemorrhagic diathesis with antihemophilic globulin (AHG) deficiency and prolonged bleeding time.
Acta Med. Scand. 159 (1957), 35

25) NILSSON,J.M.; S.MAGNUSSON; C.BORCHGREVINK:
The Duke and Ivy methods for determination of the bleeding time.
Thromb. diath. haemorrh. 1o (1963), 223

26) NYMAN,D.; A.W.ERIKSSON; W.LEHMANN; M.BLOMBÄCK:
Inherited defective platelet aggregation with arachidonate as the main expression of a defective metabolism of arachidonic acid.
Thromb. Res. 14 (1979), 739

27) PEAKE,I.R.; A.L.BLOOM; J.C.GIDDINGS:
Inherited variants of factor-VIII-related protein in von Willebrand's desease.
N. Engl. J. Med. 291 (1974), 113

28) PENICK,G.D.; H.R.ROBERTS; C.W.McMILLAN:
Assays for antihemophilic factor (factor VIII).
In: N.U.BANG; F.K.BELLER; E.DEUTSCH; E.F.MAMMEN (Eds.):
Thrombosis and bleeding disorders - Theory and methods.
Academic Press, New York 1971, pp. 189 - 192

29) QUICK,A.J.; C.V.HUSSEY:
Hemophilic condition in the female.
J. Lab. Clin. Med. 42 (1953), 929

3o) ROGERS,A.B.:
The effect of pH on human platelet aggregation induced by Epinephrine and ADP.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 139 (1972), 11oo

31) SALZMAN,E.W.:
Measurement of platelet adhesiveness: a single in vitro technique demonstrating an abnormality in von Willebrand's disease.
J. Lab. Clin. Med. 62 (1963), 724

32) SALZMAN,E.W.:
Platelet adhesiveness in von Willebrand's disease: a cooperative study.
In: BRINKHOUS,K.M. (Ed.): Hemophilia and new hemorrhagic states.
Chapel Hill, University of North Carolina Press 197o, pp. 2o5 - 214

33) SILVER,M.J.; J.B.SMITH; C.INGERMAN; J.J.KOCSIS:
Arachidonic acid-induced human platelet aggregation and prostaglandin formation.
Prostaglandins 4 (1973), 863

34) SIXMA,J.J.; J.OVER; B.N.BOUMA; A.L.BLOOM; J.R.PEAKE:
Predominance of normal low molecular weight forms of factor VIII in variant von Willebrand's disease.
Thromb. Res. 12 (1978), 929

35) SULTAN,Y.; J.SIMEON; J.P.CAEN:
Detection of heterozygotes in both parents of homozygous patients with von Willebrand's disease.
J. Clin. Path. 28 (1975), 3o9

36) SULTAN,Y.; J.SIMEON; J.P.CAEN:
Electrophoretic heterogeneity of normal factor VIII/ von Willebrand-protein, and abnormal electrophoretic-mobility in patients with von Willebrand's disease.
J. Lab. Clin. Med. 87 (1976), 185

37) TROBISCH,H.; H.Th.BRÜSTER:
Zur Biochemie und Pathobiochemie des Gerinnungs-faktors VIII (antihämophiles Globulin A).
Krankenhausarzt 52 (1979), 825

38) WEISS,H.J.; J.ROGERS; H.BRAND:
Defective Ristocetin-induced platelet aggregation in von Willebrand's disease and its correction by factor VIII.
J. Clin. Invest. 52 (1973), 2697

39) WEISS,H.J.; L.W.HOYER; F.R.RICKLES et al.:
Quantitative assay of a plasma factor, deficient in von Willebrand's disease, that is necessary for platelet aggregation. Relationship to factor VIII procoagulant activity and antigen content.
J. Clin. Invest. 52 (1973), 27o8

4o) WEISS,H.J.:
Platelet physiology and abnormalities of platelet function.
N. Engl. J. Med. 293 (1975), 531 (Part. I) 58o (Part. II)

41) WEISS,H.J.:
Congenital qualitative platelet disorders.
In: WILLIAMS,W.J.; E.BEUTLER; A.J.ERSLEV; R.W.RUNDLES (Eds.): Hematology.
McGraw Hill, New York 1977^2, pp. 1368 - 1377

42) VON WILLEBRAND,E.A.:
Über hereditäre Pseudohämophilie.
Acta Med. Scand. 76 (1931), 521

43) VON WILLEBRAND,E.A.; R.JÜRGENS:
Über ein neues vererbbares Blutungsübel: die konstitutionelle Thrombopathie.
Dtsch. Arch. Klin. Med. 175 (1933), 453

44) ZIMMERMAN,T.S.; O.D.RATNOFF; A.E.POWELL:
Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor VIII deficiency) and von Willebrand's disease, with observations on combined deficiencies of anti-hemophilic factor and proaccelerin (factor V) and an acquired circulating anticoagulant against anti-hemophilic factor.
J. Clin. Invest. 5o (1971), 244

45) ZIMMERMAN,T.S.; Ch.F.ABILDGAARD; D.MEYER:
The factor VIII abnormality in severe von Willebrand's disease.
N. Engl. J. Med. 3o1 (1979), 13o7

LEBENSLAUF

Ich wurde am 8. September 1951 als Sohn von Kurt Schommer und Lieselotte Schommer, geb. Schmitt, in Scheidt geboren.

1957 wurde ich in die Volksschule in Scheidt eingeschult und besuchte ab 1962 das Staatliche Ludwigsgymnasium in Saarbrücken. Dort habe ich 197o die Reifeprüfung abgelegt.

Mit dem Wintersemester 197o/71 begann ich an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken/Homburg das Studium der Medizin. Dort habe ich 1973 die ärztliche Vorprüfung abgelegt.

Seit dem Wintersemester 1973/74 studierte ich an der Medizinischen Hochschule in Lübeck, wo ich 1976 die ärztliche Prüfung abgelegt habe.

Nach der Medizinalassistentenzeit in Lübeck habe ich am 1. Mai 1978 die Approbation als Arzt erhalten.

Seit dem 2. Mai 1978 bin ich am Institut für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin der Universität Düsseldorf tätig.